INSTITUTUL AGRONOMIC TIMISOARA
Facultatea de agronomie
Sectia medicina veterinară

Prof. dr. POPA OCTAVIAN

MICROBIOLOGIE și IMUNOLOGIE

*

I. BACTERIOLOGIE GENERALĂ
II. VIRUSOLOGIE GENERALĂ

Pentru uzul studenților

C U P R I N S

Pag.

INTRODUCERE 1

1.Descoperirea microbilor: Leeuwenhoeck 2

2.Epoca marilor descoperiri. Louis Pasteur.Robert Koch 3

3.Scoala românească de microbiologie 8

4.Definiţia şi obiectul microbiologiei clasificarea microbilor 14

I. BACTERIOLOGIE GENERALA

1. Caracterele generale ale bacteriilor 17

2. Morfologie bacteriană 2o

2.1. Forma 21

2.2. Mod de grupare 24

2.3. Dimensiunile 28

2.4. Volumul, greutatea şi densitatea 3o

2.5. Afinităţi tinctoriale 3o

2.6. Structura celulei bacteriene 34

2.6.1. Peretele celulei bacteriene . . . 37

2.6.2. Protoplastul. 52

2.6.3. Membrana citoplasmatică 54

2.6.4. Citoplasma şi organitele citoplasmatice 6o

2.6.5. Nucleul 65

2.7. Structuri extraparietale 58

2.7.1.Glicocalixul 68

2.7.2.Invelişul mucos 69

2.7.3. Capsula 69

2.8. Organite celulare 74

2.8.1. Cilii 74

2.8.2. Pilii 81

2.9. Sporul şi sporogeneza 83

3. Fiziologie bacteriană 94
3.1. Structura chimică a bacteriilor 94
3.2. Enzimele bacteriene 1o3
3.3. Metabolismul bacterian 1o9
3.3.1. Sursele nutritive 11o
3.3.2. Tipuri de nutriţie 112
3.3.3. Pătrunderea substanţelor nutritive în celulă 114
3.3.4. Metabolismul glucidic 115
3.3.5. Metabolismul proteic 12o
3.3.6. Metabolismul lipidic 125
3.3.7. Metabolismul energetic . . . 127
3.3.8. Respiraţia la bacterii . . . 13o
4. Creşterea şi multiplicarea bacteriilor 138
4.1. Creşterea celulei bacteriene 139
4.2. Multiplicarea bacteriilor 142
4.3. Dinamica multiplicării bacteriilor în medii lichide 145
5. Relaţiile dintre bacterii şi factorii de mediu: fizici şi chimici 152
5.1. Acţiunea factorilor fizici 153
5.1.1 Temperatura 152
5.1.2. Radiaţiile 157
5.1.3. Ultrasunetele 159
5.1.4. Presiunea osmotică 16o
5.1.5. Presiunea hidrostatică . . . 161
5.2.Acţiunea substanţelor chimice 162
5.2.1. Substanţele chimice cu acţiune nespecifică 164
5.2.2. Substanţele cu acţiune specifică 168
Substanţele chimioterapice.
Sulfamidele 168
Antibioticele 172
Antibiorezistenţa 177

II. VIRUSOLOGIE GENERALA

1. Introducere 179
2. Caracterele generale ale virusurilor 180
3. Elemente de morfologie virală 184
   3.1. Dimensiunile virusurilor 184
   3.2. Forma virusurilor 186
   3.3. Structura şi organizarea morfo-chimică a virionilor 188
      3.3.1. Genomul viral 190
      3.3.2. Capsida 199
      3.3.3. Pericapsida 209
      3.3.4. Virusuri cu structură complexă 213
      3.3.5. Enzime conţinute de virusuri 215
4. Bacteriofagii 218
   4.1. Caracteristicile generale ale bacteriofagilor 219
   4.2. Fagul T_4 221
      4.2.1. Caracteristici morfo-structurale 221
      4.2.2. Infectivitatea fagilor . . . 223
   4.3. Fenomenul de lizogenie 228
5. Elemente de biologie virală 232
   5.1. Multiplicarea(replicarea)virusurilor 233
      5.1.1. Adsorbţia virusurilor pe celula gazdă 233
      5.1.2. Pătrunderea virusului în celulă 234
      5.1.3. Decapsidarea 237
      5.1.4. Ciclul productiv 238
         Biosinteza proteinelor virale 239
         Replicarea genomului viral 240
         Morfogeneza virionilor . . . 243
      5.1.5. Eliberarea virionilor din celulă 245

5.2. Tropismul virusurilor 247
5.3. Efecte citopatice 250
5.3.1. Efectul citocid 251
5.3.2. Aberaţiile cromozomale 251
5.3.3. Fuziunile celulare 251
5.3.4. Efectul incluziogen 252
5.3.5. Efectul oncogen 253
5.3.6. Efectul oncolitic 254
5.4. Fenomenul de interferenţă 255

I N T R O D U C E R E

Primele cunoştinţe despre microbi datează din a doua jumătate a secolului XVII. Descoperirea lor a însemnat pentru omenire un pas important spre cunoaşterea naturii. Au trebuit să treacă însă două secole pînă cînd "gîndirea" s-a apropiat de cunoaşterea rolului lor în natură, acceptînd ideea originii microbiene a fermentaţiilor şi a bolilor.

Pentru a impune aceste concepţii au trebuit să apară pe scena istoriei două mari personalităţi PASTEUR şi KOCH, care prin experienţele, perseverenţa şi prestigiul lor au schimbat cursul gîndirii medicale, deschizînd astfel o epocă nouă, creatoare, numită pe drept "epoca de aur" a medicinii. Descoperirile lor au dovedit pe de o parte, că bolile sînt date de microbi, iar pe de altă parte au dat omenirii speranţa că poate fi salvată de coşmarul celor mai îngrozitoare boli. Vaccinurile pasteuriene şi apoi serurile imune au salvat milioane şi milioane de vieţi.

Prin munca neobosită şi temerară a microbiologilor, omul a dovedit că este capabil să pună stavilă "morţii", să învingă bolile, considerate de milenii ca cea mai crîncenă şi pustiitoare forţă a naturii. De aceea, se poate spune fără teamă de a greşi, că cercetările lui Pasteur nu numai că au revoluţionat ştiinţele medicale şi au contribuit la dezvoltarea unor

ramuri industriale, dar în acelaşi timp au revoluţionat şi au lărgit limitele gîndirii umane, descătuşînd-o şi ridicînd-o peste milenii.

Astăzi, datorită progreselor covîrşitoare realizate în prevenirea şi combaterea bolilor infecţioase, multe din maladiile grave ale omului şi animalelor au fost eradicate de pe teritorii întinse ale globului. In faţa omenirii mai stau însă numeroase probleme încă nerezolvate. In zone geografice întinse, înapoiate din punct de vedere social şi economic, foamea, mizeria şi bolile se găsesc încă " la ele acasă". Există însă suficiente resurse umane şi materiale care ne dau garanţia şi încrederea într-un viitor luminos, în care dreptatea socială şi, prin aceasta, sănătatea şi apărarea ei, să fie bunuri cîştigate pentru fiecare om.

1. <u>DESCOPERIREA MICROBILOR: LEEUWENHOECK</u>.ANTHONY von LEEUWENHOECK (1632-1723) s-a născut în orăşelul olandez Delft. A încercat, fără succes, să facă comerţ, iar mai apoi a fost un modest funcţionar (portar) la primăria oraşului. Avea însă pasiunea de a şlefui lentile şi de a construi microscoape, sub lentilele cărora examina fel de fel de lucruri invizibile cu ochiul liber. Deşi lipsit de pregătire ştiinţifică, s-a dovedit unul din marii observatori ai naturii. Lumea îi datorează numeroase descoperiri şi observaţii. Dar ziua cînd şi-a îndreptat lentilele microscopului spre o picătură de salivă a rămas cu siguranţă neuitată. Probabil uimit, cu ochii obosiţi, se încăpăţîna să privească o lume de vieţuitoare mici şi bizare, invizibile cu ochii, necunoscute pînă atunci. Era primul muritor căruia microscopul îi revela existenţa bacteriilor, vieţuitoare "de 1.000 de ori mai mici decît orice vietate pe care o putea vedea cu ochiul liber". Neobosit, le-a descoperit rînd pe rînd, în depozitul de pe dinţi, în apa de

ploaie şi din canale, în materiile fecale proprii şi ale altora, în intestinele cailor, în apa în care înmuiase boabe de piper pentru a le cerceta de ce înţeapă etc. "Animalculele" descoperite îl fascinau, îl atrăgeau, le căuta peste tot, făcea desene, le măsura; le descria cu amănunte uneori naive şi într-un limbaj puţin academic, ca vietăţi "sprintene care se opresc, stau nemişcate, pe urmă se învîrtesc cu viteza unui prîsnel şi cercul în care se mişcă este numai cît un fir de nisip" (citat după PAUL de KRUIF,1938).

Despre descoperirile sale a făcut numeroase comunicări, pe care le-a înaintat societăţii regale din Londra, stîrnind o curiozitate imensă. Să vadă aceste vieţuitoare " miraculoase" , în casa lui LEEUWENHOECK au poposit chiar şi Petru cel Mare şi regina Angliei.

x

x x

Ulterior cu descrierea microbilor s-au ocupat numeroşi oameni de ştiinţă, unii din amuzament, iar alţii, cum a fost LINNE (1767), din dorinţa de a-i clasifica. Dar cu toate progresele înregistrate, au trebuit să treacă mai bine de două secole pentru ca lumea medicală să se apropie de înţelegerea şi acceptarea rolului microbilor în producerea bolilor.

2. EPOCA MARILOR DESCOPERIRI MICROBIOLOGICE.

LOUIS PASTEUR (1822-1895). Fiu de tăbăcar, s-a născut în localitatea Dôle, iar copilăria şi-a petrecut-o în oraşul Arbois. In 1846 absolvă Scoala normală superioară,la care este numit profesor, iar după un an obţine titlul de doctor în chimie şi fizică. La 26 ani devine cunoscut prin cercetările de cristalografie, efectuate asupra tipurilor de acid tartic. La scurt timp este chemat profesor la

Universitatea din Strassboourg, iar în 1854 este numit profesor şi decan la Scoala normală superioară din Lille. De aici, timp de peste 3 decenii, chimistul PASTEUR a ţinut lumea încordată şi a uimit-o prin cercetările sale asupra microbilor.

Primele descoperiri privind rolul microorganismelor în natură sînt realizate de PASTEUR în 1857, în cursul cercetărilor întreprinse asupra fermentaţiei alcoolice şi a cauzelor care duc la pierderi în industria producătoare de alcool. Pînă în 1865, rînd pe rînd, PASTEUR cercetează şi descoperă levurile care produc fermentaţia alcoolică, acetică, lactică, butirică, precum şi microorganismele care produc alterarea berii, vinului etc. Rezultatele obţinute au dus la revoluţionarea concepţiilor despre natura proceselor fermentative, dovedind că acestea au o origine biologică şi că sînt opera "drojdiilor" (levurilor) care trăiesc şi se înmulţesc pe seama zahărului conţinut în sucul de sfeclă, de vin etc. Descoperirile pe care le-a făcut în aceste domenii au fundamentat cunoştiinţele despre rolul unor microorganisme în natură, în realizarea diverselor procese fermentative, punînd în acelaşi timp bazele unor tehnologii moderne în industria fermentativă.

La finele acestor cercetări, PASTEUR cîştigase deja o autoritate ştiinţifică imensă, numele său depăşind graniţele ţării. Tot în aceea perioadă industria franceză de mătase se găsea în pragul dezastrului, deoarece creşterea viermilor de mătase întîmpina mari dificultăţi din cauza unor boli necunoscute. Crescătorii îi solicită sprijinul în 1865. Timp de 6 ani (pînă în 1871) PASTEUR se angrenează într-o muncă istovitoare, în căutări fără răgaz, în cursul cărora a simţit şi gustul amar al înfrîngerilor şi bucuria ameţitoare a victoriilor. Cercetările s-au terminat însă cu cîteva descoperiri deosebit de importante. S-a stabilit astfel

că bolile sînt produse de germeni, că viermii se infectează consumînd frunzele murdărite de cei bolnavi şi că infecţia se transmite prin ouăle provenite de la fluturii infectaţi, precizînd totodată măsurile ce se impun pentru prevenirea şi combaterea lor.

In această epocă PASTEUR îşi formează convingerea că şi bolile omului şi animalelor ar putea fi procese asemănătoare unor fermentaţii nedorite, produse probabil de germenii care invadează organismele, la fel ca în cazul viermilor de mătase. Aceste opinii le comunică, în 1873, la Academia de medicină din Paris, afirmînd că "între boală şi prezenţa microorganismelor există o corelaţie strînsă." PASTEUR se apropie astfel tot mai mult de abordarea problemelor medicale, de înţelegerea rolului pe care microbii îl pot avea în producerea bolilor. Evenimentele sînt însă precipitate de experienţele întreprinse în Germania de ROBERT KOCH, care dovedeşte în 1876 că Bacillus anthracis este agentul etiologic al antraxului la animale. Din acest moment, între Pasteur şi Koch, de fapt între ştiinţa franceză şi germană, începe o adevărată întrecerea în domeniul descoperirilor microbiologice. Ca urmare, în scurt timp, la Paris şi Berlin s-au conturat două importante centre şi şcoli de microbiologie.

In 1878, PASTEUR, JOUBERT şi CHAMBERLAND enunţă, la Academia de medicină din Paris, teoria originii microbiene a bolilor, concepţie care a declanşat o adevărată "furtună" în lumea medicală. In perioada imediat următoare, PASTEUR descoperă streptococii care produc febra puerperală la femeie, stafilococii care produc furunculoza la om şi întreprinde studii asupra germenilor care produc holera la păsări şi antraxul la animale etc. Cercetările sale sînt însă tot mai mult orientate spre găsirea unor mijloace de prevenire şi combatere a bolilor, spre descoperirea vaccinurilor.

Reuşeşte astfel să stabilească mijloacele prin care Pasteurella poate fi atenuată, utilizînd apoi aceşti germeni la prepararea unui vaccin contra holerei aviare (188o). Reuşeşte apoi să descopere mijloacele prin care să poată atenua Bacillus anthracis, iar cu tulpinile atenuate prepară vaccinul contra antraxului, a cărui eficacitate o demonstrează în public, în 1881. Incepe astfel marea epopee a descoperirii şi utilizării vaccinurilor, care îl duce pe PASTEUR pe culmi de glorie neatinse încă de alt muritor.

Intre 1882 - 1884 preocupările sale sînt îndreptate spre găsirea mijloacelor de preparare a vaccinului contra turbării, pe care îl experimentează la început pe cîini. Un an mai tîrziu (1885) vaccinul antirabic preparat de PASTEUR salvează din ghiarele turbării primele vieţi omeneşti.

Opera lui PASTEUR este deosebit de vastă. De numele lui se leagă indisolubil formarea şcolii franceze de microbiologie şi transformarea cunoştinţelor despre microbi, într-o ştiinţă care a cucerit medicina şi lumea. Prin toată activitatea sa, PASTEUR aparţine omenirii, situîndu-l pe drept în fruntea marilor ei binefăcători. Cuvintele rosite la congresul de medicină de la Copenhaga (1884), cînd se afla în plină glorie, vibrează de un cald patriotism şi umanism: "Stiinţa nu are patrie, sau, mai bine zis, patria ştiinţei cuprinde omenirea în întregime. Dar dacă ştiinţa nu are patrie, omul de ştiinţă trebuie să aibă în permanenţă grija să facă tot ceea ce poate aduce glorie patriei sale. In orice savant mare veţi găsi întotdeauna şi un mare patriot". Aceste cuvinte sînt fără îndoială nu numai un răspuns dat celor care i-au criticat atitudinea sa patriotică înfocată, ci şi un bogat mesaj transmis generaţiilor, menit să dăinuie peste veacuri.

ROBERT KOCH (1843-1910). Obţine diploma de doctor în 1866 şi îşi începe activitatea ca medic de circumscripţie. Cucerit de noile concepţii despre originea microbiană a bolilor, începe să efectueze cercetări asupra antraxului. Fire meticuloasă, înarmat cu o mare putere de muncă şi răbdare, găseşte şi identifică bacilii în sîngele animalelor moarte de antrax (1876), pe care îi izolează şi îi cultivă pe medii artificiale pentru prima dată, iar cu aceştia reuşeşte să transmită infecţia la animale de experienţă (şoareci, cobai, iepuri). Dovedeşte astfel neîndoielnic rolul pe care germenii îl au în producerea bolii. Tot el descoperă proprietatea bacililor de a sporula, dovedind că aceştia se pot conserva în pămînt, timp îndelungat, sub formă de spori.

In 1880 KOCH este numit consilier la Berlin, asigurîndu-i-se toate condiţiile pentru organizarea unui laborator, care devine în scurt timp un centru proeminent de cercetări bacteriologice. Intre meritele sale trebuie reţinut şi faptul că este primul care a înţeles că Microbiologia, ca orice ştiinţă nouă, necesită înainte de toate o tehnică de lucru şi o metodică precisă de cercetare, care să-i confere caracterele de ştiinţă exactă. Strădaniile sale au dus la punerea la punct a unor mijloace de izolare şi cultivare în stare pură a germenilor, la găsirea a unor tehnici de colorare a bacteriilor şi la fundamentarea "postulatelor" pe baza cărora un germen poate fi considerat agent etiologic al unei boli (germenii să fie găsiţi constant în materialele patologice provenite de la organismele bolnave sau moarte de aceiaşi boală, să poată fi izolaţi şi cultivaţi în stare pură, iar cu germenii din culturile pure să se poate reproduce la animalele infectate experimental o boală identică sau foarte asemănătoare cu cea naturală).

Lui KOCH îi datorăm numeroase alte descoperiri. In anul 1882, după îndelungate cercetări, descoperă bacilul tuberculozei, ceea ce îi atestă celebritatea mondială, situîndu-l, alături de PASTEUR, în rîndul fondatorilor microbiologiei. In anii care au urmat îşi continuă cercetările în domeniul tuberculozei, reuşind să prepare tuberculina şi să descopere alergia tuberculoasă, devenind astfel fondatorul unei ştiinţe noi, "alergologia".

In 1884, în cursul cercetărilor efectuate în India, descoperă vibrionul holerei umane. Intreprinde deasemenea cercetări în ciuma bubonică, boala somnului, malarie, pleuropneumonia contagioasă şi pesta bovină şi în numeroase alte domenii.

Activitatea sa este încununată în 1905 cu premiul Nobel, cu menţiunea "celui mai distins cercetător contemporan".

x

x x

Din şcoala pasteuriană s-au ridicat mari cercetători: ROUX, MECINIKOV, YERSIN, BORDET, GUERIN şi CALMETTE şi mulţi alţii. VICTOR BABES şi ION CANTACUZINO s-au format şi ei tot aici. Scoala germană a dat de asemenea figuri proeminente: LOFFLER, GAFFKY, BEHRING, EHRLICH, japonezul KITASATO etc.

3. <u>SCOALA ROMANEASCA DE MICROBIOLOGIE.</u> Marile cuceriri microbiologice au pătruns rapid în patria noastră, şcoala şi ştiinţa microbiologică românească fiind opera unor personalităţi medicale de renume mondial, în frunte cu VICTOR BABES, ION CANTACUZINO, PAUL RIEGLER şi alţii.

<u>VICTOR BABES</u> (1854 - 1926). Originar din Banat, studiază medicina la Budapesta, afirmîndu-se de tînăr ca un bun cercetător. Aici devine asistent şi apoi profesor.

B.C.U. "Dr. Carol Davila"

Descoperirile pasteuriene exercită şi asupra lui un miraj. Intre 1881 - 1884 îl găsim la Paris, unde lucrează o perioadă de timp în laboratorul lui PASTEUR. Se afirmă şi cîştigă un mare prestigiu. Ca dovadă, în 1885, CORNIL (profesor la Facultatea de medicină din Paris) şi BABES scot împreună primul tratat de bacteriologie din lume.

Animat de un cald patriotism, răspunde chemării de a veni în ţară (1887) ca profesor de Anatomie patologică şi Bacteriologie, la Facultatea de medicină din Bucureşti. Pînă la sfîrşitul vieţii desfăşoară o muncă titanică. Descoperirile sale îl fac tot mai cunoscut, devenind una din figurile preeminente ale ştiinţei mondiale. Activitatea lui BABES s-a concretizat în mai mult de looo de lucrări ştiinţifice şi în descoperirea a peste 5o de microorganisme patogene.

De la început se preocupă de problema turbării, trecînd la organizarea la Bucureşti a unui centru pentru prepararea şi aplicarea vaccinului antirabic. Descoperă că serul provenit de la animalele vaccinate antirabic are o acţiune preventivă în turbare; îmbunătăţeşte tehnica de preparare a vaccinului şi introduce pentru prima dată (1889) metoda de **sero-vaccinare** în profilaxia turbării la om, putînd fi astfel considerat întemeietorul sero-terapiei. De asemenea, este primul care descoperă (1892) prezenţa la animalele moarte de turbare a incluziilor situate în citoplasma celulelor nervoase piramidale (corpusculii Babeş-Negri). Descoperă apoi corpusculii metacromatici din bacilii difterici (1884) şi granulaţiile din bacilii tuberculozei şi leprei. A făcut studii asupra antagonismului bacterian, enunţînd ideea folosirii posibile a acestui fenomen în tratamentul bolilor infecţioase. Intreprinde cercetări de bază asupra bacilului leprei, se preocupă de cercetări în ciumă, sifilis, rujeolă, scarlatină, variolă, rubeolă, febra galbenă, herpes, tifos exantematic, holeră, poliomelită,

cancer etc.

BABEŞ şi-a înscris numele şi în rîndul marilor cercetători în domeniul medicinei veterinare. In colaborare cu medicul veterinar STARCOVICI, a descoperit în 1888 agentul etiologic al piroplasmozei la bovine, un parazit endoglobular denumit în cinstea sa Babesiella bovis. In 1892, a descoperit la oile bolnave de "cîrceag" un parazit asemănător (Babesiella ovis).

Deschizător de drumuri în Microbiologie, marele fiu şi microbiolog român VICTOR BABEŞ aparţine umanităţii nu numai prin cercetările sale, ci şi prin poziţia de militant social. Studiul unor boli larg răspîndite în acea epocă, cum sînt pelagra şi tuberculoza, l-au dus la înţelegerea dualităţii existente între boală şi mizerie. Patriotismul şi umanismul care l-au călăuzit toată viaţa, l-au determinat să demaşte cu vehemenţă mizeria şi nedreptatea socială, pe care le consideră racile ale politicianismului şi demagogiei, a indiferenţei şi inconştienţei clasei oligarhice. Vocea sa s-a ridicat hotărîtă, de repetate ori, împotriva afacerismului, a nepotismului, a nepăsării criminale a conducătorilor oligarhiei politice, a analfabetismului şi mizeriei, militînd pentru dreptate socială şi situîndu-se, astfel, în fruntea intelectualităţii progresiste din ţara noastră. In discursul ţinut la deschiderea Universităţii din Cluj în 1919, BABEŞ a demascat politicianismul ca o "cauză a tuturor relelor", afirmînd deschis că "este o datorie patriotică să întrebuinţăm toate mijloacele pentru a-l nimici, pentru a-l înlocui cu o altă putere, care să ne garanteze regenerarea şi progresul". Prin aceste cuvinte şi prin altele, din inima şi gîndurile sale răzbăteau un cald umanism şi o mare dragoste de popor. O asemenea atitudine i-a atras numeroase critici şi represiuni, autorităţile creind în jurul său un adevărat complot al tăcerii. Pensionarea

înainte de vreme a fost şi ea una din măsurile luate, pentru ca ideile şi glasul său să nu răzbată în rîndurile tineretului studios.

VICTOR BABEŞ rămîne însă mare prin tot ce ne-a lăsat. In institutul care îi poartă numele, sub îndrumarea directă a lui, s-au format în ţară numeroşi microbiologi şi anatomo-patologi: PAUL RIEGLER, creator şi fondator al şcolii româneşti de microbiologie veterinară; LEVADITI (1874-1953), unul din cei mai mari virusologi ai secolului XX; NICOLAU, fondatorul şcolii româneşti de inframicrobiologie şi alţii.

ION CANTACUZINO (1863 - 1934). Figură proeminentă a ştiinţei medicale româneşti şi mondiale, de a cărui activitate se leagă indisolubil înfiinţarea institutului care-i poartă numele şi a şcolii româneşti de bacteriologie. Format în Institutul PASTEUR din PARIS, în laboratorul condus de MECINIKOV, aduce în ţară suflul creator al şcolii pasteuriene, contribuind la dezvoltarea cercetărilor fundamentale şi aplicative de microbiologie şi imunologie.

Contribuţiile sale ştiinţifice sînt multiple. L-au preocupat în mod deosebit cercetările de imunologie, întreprizînd şi aducînd contribuţii importante în cercetarea fenomenelor de imunitate în seria animală. Efectuează apoi cercetări asupra variabilităţii microbiene, dar mai ales desfăşoară o activitate intensă pentru organizarea preparării în ţară a serurilor şi vaccinurilor; serul antistreptococic (19o4) şi antidezinteric (19o3), vaccinul antiholeric (1912), vaccinul antitifoparatifoidic (1913) şi altele.

Se dovedeşte totodată un mare organizator al luptei antiepidemice, legea sanitară din 191o fiind una din importantele sale opere organizatorice şi sociale. Vaccinul antiholeric preparat de Cantacuzino şi aplicat în 1913 în Bulgaria, la soldaţi şi populaţie, cînd în acea zonă bîntuia holera, a reprezentat cea mai mare

experienţă de imunizare în masă, aplicată la oameni pînă atunci. Soldată cu succes deplin, acţiunea temerară a lui CANTACUZINO a intrat în istoria medicinei sub denumirea de "mare experienţă romană".

In timpul primului război mondial, în special în perioada de restrişte din Moldova, a organizat întreaga luptă antiepidemică contra tifosului exantematic şi al altor boli.

Infiinţarea Institutului de seruri şi vaccinuri Cantacuzino (1921) şi şcoala de bacteriologie formată în acest institut, sînt în cea mai mare parte opera sa.

De numele său se leagă şi începuturile vaccinării antituberculoase în ţara noastră (1926), Romania fiind a doua ţară din lume, după Franţa, care a aplicat BCG-ul în profilaxia tuberculozei.

Dovadă a prestigiului ştiinţific de care s-a bucurat pe plan mandial, o constituie şi faptul că efigia de bronz a figurii sale se găseşte în holul muzeului memorial de la Institutul "PASTEUR" din Paris, alături de a celorlalţi mari "pasteurieni".

PAUL RIEGLER (1867 - 1936). Elev şi colaborator apropiat a lui BABES şi CANTACUZINO, este întemeietorul şcolii româneşti de microbiologie veterinară. A adus contribuţii importante în cunoaşterea unor numeroase boli: morvă, pesta porcină, tuberculoză, a infecţiilor la peşti produse de germeni din genul Proteus etc.

RIEGLER este totodată şi întemeietorul învăţămîntului microbiologic veterinar şi al şcolii româneşti de microbiologie veterinară. Sub îndrumarea sa s-au format numeroşi cercetători care au adus contribuţii importante la dezvoltarea ştiinţei medicale veterinare din ţară, îmbogăţind patrimoniul ştiinţei mondiale. De numele lui se leagă organizarea în ţară a laboratoarelor

de diagnostic bacteriologic. Dar marea operă a vieţii sale rămîne fără îndoială organizarea luptei de prevenire şi combatere a bolilor infecţioase la animale, prepararea vaccinurilor şi a serurilor imune şi înfiinţarea în 1911 a Institutului Pasteur, al cărui conducător a rămas toată viaţa.

Sub îndrumarea directă a lui RIEGLER, Institutul de seruri şi vaccinuri "Pasteur" a devenit o importantă şcoală de microbiologie şi imunologie veterinară, în care s-au format numeroşi cercetători de prestigiu, prin contribuţia cărora ştiinţa românească s-a afirmat pe plan naţional şi internaţional.

x

x x

După 1944 dezvoltarea Institutului "Pasteur" şi a reţelei de laboratoare veterinare de diagnostic a marcat un avînt considerabil. Sub grija şi îndrumarea atentă a conducerii partidului şi a statului nostru s-au făcut investiţii considerabile în acest domeniu. Institutul de cercetări veterinare şi biopreparate "Pasteur" din Bucureşti a fost dotat cu clădiri şi laboratoare moderne şi dispune astăzi de mai multe centre zonale în care se prepară zeci de produse biologice (vaccinuri, seruri imune, produse biologice revelatoare etc.). Dacă la aceste realizări adăugăm şi cele cîteva zeci de laboratoare veterinare de diagnostic înfiinţate în ultimele două decenii, existente astăzi în toate judeţele ţării, avem imaginea clară a dezvoltării sectorului de microbiologie veterinară şi de diagnostic a bolilor la animale în ţara noastră, a grijii acordate de regimul nostru dezvoltării zootehniei , şi implicit, a supravegherii sanitare a efectivelor de animale.

4. DEFINITIA SI OBIECTUL MICROBIOLOGIEI, CLASIFICAREA MICROBILOR.

In sens larg, microbiologia poate fi definită ca ştiinţa care se ocupă cu studiul unor vieţuitoare numite generic "microbi" [1]. Conţinutul şi sfera noţiunii de "microb"sînt însă puţin precizate. Unii consideră termenul sinonim cu cel de bacterie, dar cei mai mulţi microbiologi îi atribuie un sens şi un conţinut larg,aşa cum rezultă din analiza etimologică a cuvîntului (mikros= mic şi bios=viaţă). Ca urmare, în accepţiunea largă,prin noţiunea de "microb" sau "microorganism" sînt definite grupe foarte variate de vieţuitoare, de dimensiuni foarte mici, invizibile cu ochiul liber, cu o structură şi organizare relativ simplă, situate pe trepte de evoluţie de regulă uniceluară sau subcelulară. Din categoria acestora fac parte virusurile, bacteriile, ciupercile microscopice (inclusiv cele cu o organizare pluricelulară nediferenţiată), precum şi algele microscopice şi protozoarele.

Incadrarea într-o sistematică unitară a unor vieţuitoare atît de heterogene întîmpină-evident -mari dificultăţi, generate atît de marea lor diversitate, cît şi de faptul că unele microorganisme se apropie prin anumite caracteristici de regnul animal (protozoarele zooflagelate), iar altele de regnul vegetal (protozoarele fitoflagelate, bacteriile, ciupercile microscopice, algele). Privite în ansamblu, aceste vieţuitoare au însă trăsături distinctive de restul lumii vii,ele fiind situate pe trepte inferioare de evoluţie şi

---

1) Termenul de "microb" a fost creiat de chirurgul francez SEDILLOT (1878), fiind preluat şi generalizat imediat de PASTEUR.

organizare. Ca atare, s-a propus să fie încadrate în sistematică într-un regn distinct, regnul Protista[1] sau al"microbilor". Regnul cuprinde două încrengături: Protozoa (cu sens de "primele animale") şi Protophyta (cu sens de "primele plante").

Se întîmpină însă mari dificultăţi în privinţa stabilirii în cadrul regnului a poziţiei diverselor grupe (clase) de microorganisme. Problema a devenit şi mai complicată în ultima perioadă, cînd s-a impus diferenţierea în cadrul regnului a două mari categorii de vieţuitoare unicelulare, între care există deosebiri fundamentale foarte mari în privinţa tipului de organizare endocelulară: protistele "superioare", vieţuitoare cu o organizare endocelulară de tip eucariot (protozoarele, ciupercile microscopice, majoritatea algelor etc.) şi protistele "inferioare", vieţuitoare cu o organizare endocelulară de tip procariot (bacteriile, algele albastre etc.). Intre aceste două categorii de vieţuitoare nu s-au găsit forme intermediare de trecere, apreciindu-se că pe plan evolutiv între ele există o "prăpastie" imensă, un "gol" considerat ca cea mai mare "discontinuitate" cunoscută pînă în prezent în evoluţia lumii vii (STANIER, 1966).

Asemenea dificultăţi obiective, cît şi insuficienta cunoaştere a acestor vieţuitoare, fac ca problema clasificării protistelor să fie foarte arbitrară şi controversată. De aceia, unii cercetători au propus îmbunătăţirea sistematicii vieţuitoarelor, prin crearea a 4 sau 5 regnuri, în unele din acestea urmînd

---

1) Termenul "Protista" a fost introdus în sistematică de HAECKEL (1866) cu înţelesul de "primele vieţuitoare".

să fie cuprinse numai anumite categorii de microorganisme. Intrucît problema rămîne controversată şi deschisă, redăm o schemă simplă şi orientativă de clasificare şi a poziţiei pe care o ocupă aceste vieţuitoare în regnul Protista (după STAMATIN, 1965).

Regnul	Protista sau al microbilor	
Increngătura	Protoza (protozoare= primele animale)	Protophyta (protofite =primele plante)
Subîncrengătura	- Schizophyceae (protofite cu pigmenţi fotosintetiuanţi)	Schizomycese (pretofite lipsite de pigmenţi)
Clasa sau grupa	- -	Virusuri, Bacterii Ciuperci microscopice (fungi)

Dintre protiste, în preocupările microbiologiei intră prin accepţiune numai cîteva clase sau grupuri: virusurile, bacteriile şi ciupercile microscopice. Prin amploarea pe care a luat-o studiul acestora, s-au conturat astăzi adevărate ramuri sau ştiinţe distincte: bacteriologia, virusologia, micologia. In cadrul microbiologiei s-au dezvoltat apoi diverse subramuri: microbiologia medicală, microbiologia industrială, microbiologia alimentară, microbiologia agricolă, microbiologia marină etc.

I.

BACTERIOLOGIE GENERALA

1. CARACTERELE GENERALE ALE BACTERIILOR

Bacteriile formează în sistematică clasa Schizomycetes (Naegeli,1857) sau Bacteria (Cohn 1872). Sînt vieţuitoare foarte heteromorfe, larg răspîndite în natură, constituind o partea importantă a biosferei. Cele mai multe sînt saprofite (sapros-putrid) şi au rol covîrşitor în circulaţia complexă a materiei în natură. Din imensitatea lumii bacteriene, un număr relativ restrîns de specii au evoluat spre o viaţă parazitară, devenind patogene pentru om, animale şi plante.

Deşi foarte mult diversificate, bacteriile sînt definite prin cîteva caracteristici generale, ca un grup distinct de vieţuitoare.

1.1. Ecologic, bacteriile sînt considerate pe drept vieţuitoare ubicvitare. Ele se găsesc în natură răspîndite peste tot, de la suprafaţa Terei pînă în adîncul oceanelor, din zonele cele mai aride pînă în lumea gheţurilor veşnice. Pe fondul marii lor plasticităţi s-au adaptat la condiţii foarte variate de mediu şi viaţă. Numeroase grupe specializate de bacterii trăiesc în sol, altele în apele de suprafaţă (dulci, saline, sulfuroase, feruginoase, termale etc.) şi în apele marine etc. Unele bacterii trăiesc, ca floră epifită sau comensuală, pe pielea şi mucoasele omului şi animalelor, dar mai ales în anumite compartimente ale tubului digestiv. Un număr relativ restrîns de specii au devenit parazite pentru organismele animale sau vegetale, la care produc boli specifice.

Bacteriile au rol important în natură. Pe fondul autotrofismului şi heterotrofismului lor, intervin activ şi în proporţii nebănuite în procese foarte variate de sinteză şi degradare a materiei. Sînt responsabile de

numeroase transformări geochimice, dar mai ales de realizarea proceselor de putrefacţie a cadavrelor vegetale şi animale, în cursul cărora materia organică macromoleculară, inaccesibilă sub această formă plantelor, este degradată şi mineralizată, putînd astfel reintra în circuitul biogen. Multe specii bacteriene intervin activ în degradarea diferitelor deşeuri de natură organică, îndeplinind astfel un rol major în depoluarea mediului ambiant.

Se poate conchide că bacteriile constituie, alături de alte microorganisme, o verigă esenţială în circulaţia complexă şi în sensuri multiple a materiei. Prin mijlocirea lor, natura este supusă unor procese continui de transformări înnoitoare, fără de care viaţa pe planeta noastră ar fi imposibilă.

1.2. Bacteriile sînt vietuitoare unicelulare, foarte heteromorfe, cu dimensiuni cuprinse între 0,1 -15 micrometri. Celula este protejată de un perete (membrană) cu o structură rigidă, care conferă fiecărei specii o formă caracteristică. Se disting patru tipuri morfologice principale: coc, bacil, vibrion, spirochet.

1.3. Structura şi organizarea endocelulară sînt relativ simple, definind bacteriile ca vieţuitoare procariote. Unitatea morfo-biologică a celulei este protoplastul, formaţiune care cuprinde toate organitele endocelulare, delimitate la exterior de membrana citoplasmatică.

Masa citoplasmatică este densă şi aparent omogenă, fără o structură bine definită. Dintre organitele citoplasmatice, la bacterii lipsesc mitocondriile.

Aparatul nuclear este, de asemenea, foarte puţin individualizat. El este lipsit de membrană nucleară şi de o structură internă propriu zisă, fiind alcătuit

din una sau mai multe înghemuiri fibrilare neregulate, care plutesc în masa citoplasmatică. Intregul aparat nuclear este format de fapt dintr-un singur filament de ADN dublu catenar, foarte lung, cu numeroase super-răsuciri şi plieri. Capetele sale sînt legate, alcătuind un cromozom unic, care, după derulare, are o configuraţie circulară.

Ca urmare, bacteriile au o organizare genetică haploidă, totalitatea genelor care alcătuiesc cromozomul unic al celulei găsindu-se şi ele sub o formă unică. O asemenea organizare genetică are profunde implicaţii biologice, la bacterii lipsind fenomenele de dominanţă şi recisivitate a caracterelor, iar modificările genetice produse prin mutaţii sau recombinări genetice exprimîndu-se imediat la descendenţi.

Ansamblul acestor caracteristici deosebesc fundamental bacteriile, respectiv vieţuitoarele procariote, de vieţuitoarele eucarioate a căror organizare endocelulară este mult mai evoluată.

1.4. Multiplicarea bacteriilor se realizează obişnuit prin sciziparitate, iar aparatul nuclear se divide pe cale amitotică (prin replicarea filamentului de ADN). In anumite condiţii, între celulele diferenţiate ca polaritate sexuală (F^+ şi F^-) se pot realiza procese de conjugare, acestea avînd însă un caracter strict de fertilizare genetică şi nu de multiplicare. Excepţional, anumite grupe de bacterii se pot multiplica şi pe alte căi (înmugurire, fragmentare etc.)

5. Bacteriile sînt în majoritatea lor lipsite de pigmenţi fotosintetizanţi, cu excepţia cîtorva

grupe de bacterii.[1] Energia necesară activităţii vitale şi-o procură prin reacţii chimice exergonice. De aceea bacteriile pot fi definite în general ca vieţuitoare strict chemotrofe (chemosintetizante). Ele posedă un bogat echipament enzimatic, care le permite să utilizeze, în metabolismul plastic şi energetic, componente organice şi anorganice foarte variate. Din acest punct de vedere, lumea bacteriană poate fi împărţită în două categorii:

- bacterii autotrofe, care utilizează ca substrat nutritiv exclusiv componente de natură anorganică;
- bacterii heterotrofe, care necesită obligator surse organice de C şi N, dar pot utiliza şi diferiţi compuşi anorganici.

2. MORFOLOGIE BACTERIANA

Cunoaşterea caracteristicilor morfologice are o importanţă deosebită în cercetarea şi identificarea bacteriilor.

In general, în condiţii optime şi identice de viaţă şi mediu, caracterele morfologice proprii unor specii sau grupe de bacterii au o constanţă apreciabilă şi de aceia servesc ca importante criterii taxonomice, fiind totodată de o utilitate practică esenţială în lucrările curente de diagnostic bacteriologic.

Trebuie consemnat însă faptul că, în limitele caracteristicilor morfologice definitorii pentru o specie sau un grup de bacterii, se întîlnesc în mod normal nu-

---

1) Unele grupe de bacterii autotrofe din hidrosferă posedă anumiţi pigmenţi fotosintetizanţi (bacteriopurpurina, bacterioclorina), ceea ce le permit să utilizeze energia radiaţiilor luminoase. Din categoria acestora fac parte: bacteriile verzi (Chlorobacteriaceae), bacteriile sulfurice roşii (Thiorhodaceae) şi bacteriile nesulfurice roşii (Athiorhodaceae).

meroase aspecte de variabilitate privind: forma, dimensiunile, prezenţa sau absenţa capsulei, a cililor, a sporilor etc. Aceste aspecte de variabilitate morfologică sînt determinate de numeroşi factori endogeni sau exogeni, mai ales de starea fiziologică a celulelor bacteriene, de condiţiile de viaţă pe care le oferă mediile artificiale de cultivare, de prezenţa în aceste medii a unor substanţe etc.

Proprietatea unei specii bacteriene de a se prezenta sub aspecte morfologice variate este definită ca "polimorfism" sau "pleomorfism". Asemenea fenomene de polimorfism sînt, de regulă, mai accentuate la germenii cultivaţi în medii artificiale şi cu atît mai evidente, cu cît mediul este mai puţin favorabil, cultura mai veche, iar celulele bacteriene mai îmbătrînite. In general, la bacteriile patogene aspectele morfologice cele mai caracteristice le găsim la germenii prezenţi în materialele patologice (cadavre, puroi, secreţii ş patologice etc.).

2.1. FORMA. Bacteriile sînt în general heteromorfe, caracterizîndu-se printr-o mare diversitate de forme şi prin numeroase aspecte de variabilitate morfologică. Deşi sînt foarte diversificate se pot încadra totuşi în patru tipuri morfologice: cocі, bacili, vibrioni şi spirochete (fig.1).

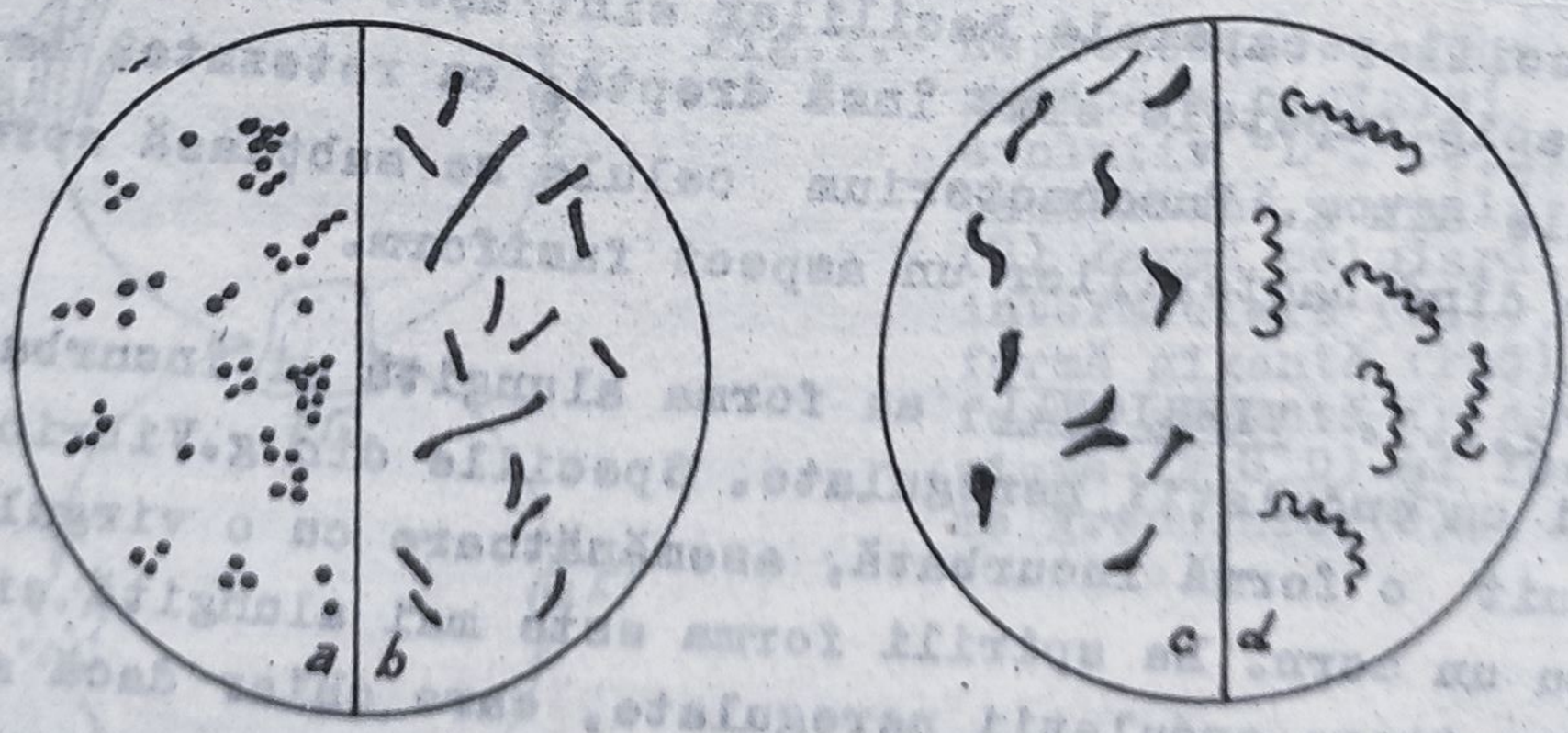


Fig.1.- Forme la bacterii: cocі (a), bacili (b), vibrioni (c) şi spirochete (d).

2.1.1. COCII au o formă sferoidală, aparent rotundă, uneori uşor ovalară sau chiar neregulată. Unele specii de cocci au o formă particulară caracteristică: astfel la Streptococcus pneumoniae (pneumococ) celulele bacteriene au formă ovalară lanceolată, iar la Neisseria gonorrhoeae (gonococ) o formă ovalară reniformă.

2.1.2. BACILII au formă cilindrică, mai mult sau mai puţin alungită, asemănătoare unui bastonaş. La unele specii forma bacilară este uşor aplatizată (Ehrysipelothrix insidiosa). Numeroase specii de bacili prezintă obişnuit aspecte de polimorfism: forme cocoide şi cocobacilare, forme naviculare, forme bacilare foarte mult alungite care au aspect filamentos etc.

Intre bacili există apoi numeroase deosebiri în privinţa grosimii şi lungimii sau a formei pe care o au capetele bacililor. La unele specii formele bacilare sînt subţiri, fine, de regulă rectilinii (E.insidiosa), iar la altele pot fi uşor încurbate (Mycobacterium tuberculosis); din contră, alte specii au forme bacilare groase (Bacillus anthracis, Clostridium sp.etc.) La majoritatea speciilor capetele bacililor sînt uşor rotunjite. La B.antracis capetele sînt însă drepte, ca retezate. La speciile din g. Fusobacterium celula se subţiază spre capete dînd bacteriilor un aspect fusiform.

2.1.3. VIBRIONII au forma alungită şi încurbată, uneori cu ondulaţii neregulate. Speciile din g.Vibrio au obişnuit o formă încurbată, asemănătoare cu o virgulă sau cu un corn. La spirili forma este mai alungită şi prezintă cîteva ondulaţii neregulate, care chiar dacă se produc în mai multe planuri, nu formează totuşi un tur complet de spiră.

2.1.4. SPIROCHETELE au aspect filiform, filamentele fiind foarte subţiri şi lungi, cu numeroase ondulaţii

sub formă de spire regulate (asemănătoare unui tirbuşon). Aspectul spirelor poate fi diferit: de exemplu, speciile din g.Leptospira au spire numeroase (cîteva zeci) foarte strînse şi regulate, în timp ce speciile din g.Borrelia au spire mai largi şi mai puţin regulate.

2.1.5. ASPECTE PARTICULARE DE VARIABILITATE MORFOLOGICA. La numeroase specii bacteriene se întîlnesc frecvent aspecte de polimorfism, acestea fiind de regulă mai accentuate în culturile vechi. In cazul cultivării unor bacterii în condiţii deosebite de mediu şi viaţă pot lua însă naştere forme care se abat de la aspectele morfologice normale. De exemplu, la unele specii bacteriene cultivate pe medii care conţin carbonat de litiu se pot întîlni forme în Y, ramificate, filamentoase, globuloase etc. Asemenea aspecte, definite în general ca forme aberante (monstruoase), pot apărea şi în alte condiţii de mediu. Uneori pot lua naştere forme aberante de tipul unor plasmodii (sinciţii sau symplaste), constituite din aglomerări de mai multe celule nesepărate între ele.

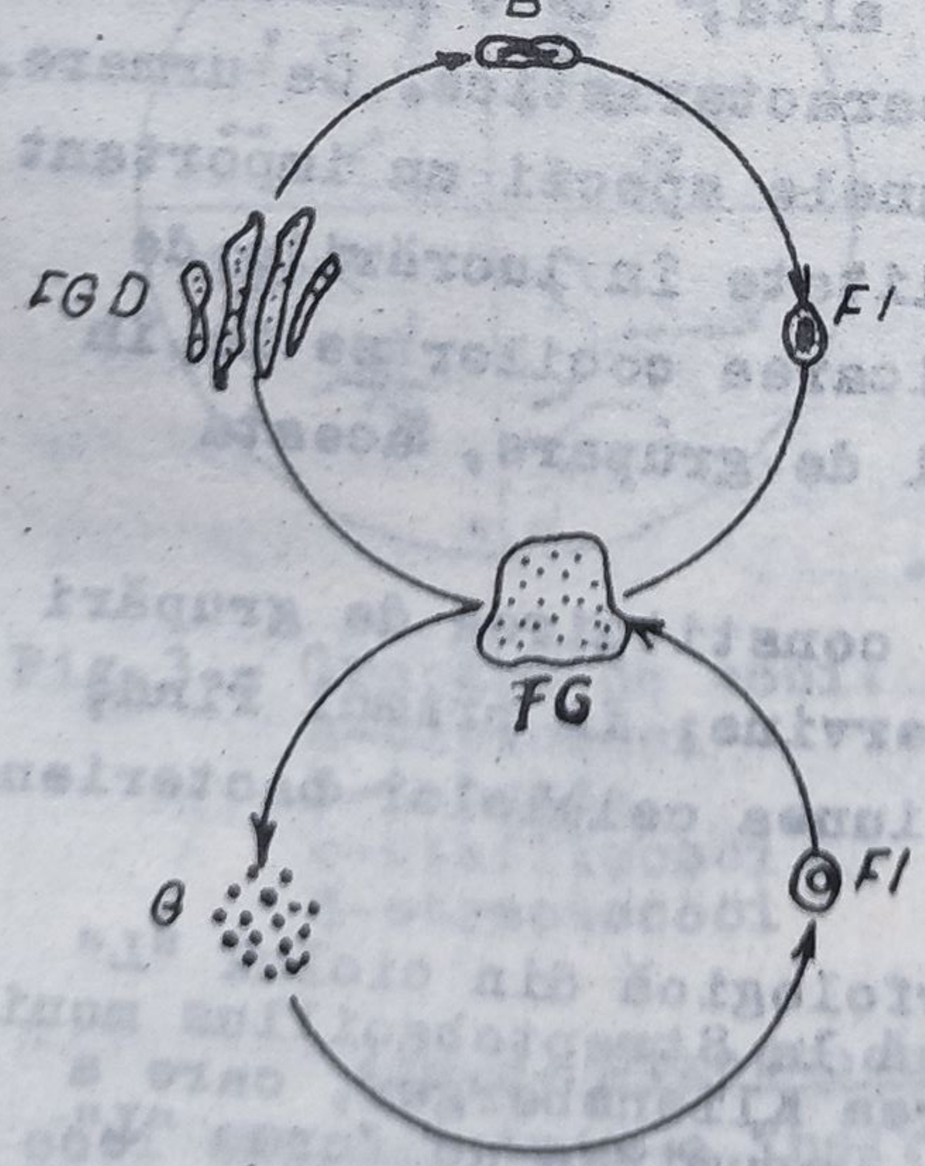


Fig.2.- Reprezentarea schematică a ciclului evolutiv "L". Celulă bacteriană normală (B) formă celulară intermediară (F.I), formă gigantă (F.G), formă gigantă în diviziune (F.G.D) şi forme granulare (G).

Semnificaţia biologică a formelor aberante este mai puţin elucidată, unele fiind considerate ca expresia a unor procese degenerative, determinate de condiţii de mediu şi viaţă mai puţin favorabile. Din contră, anumite aspecte de polimorfism sînt interpretate ca procese de variabilitate aparţinînd unui ciclu evolutiv complex. Se ştie, de exemplu, că unele bacterii cultivate pe medii care conţin penicilină (sau în alte condiţii) pot trece prin procese complexe de transformare şi reorganizare morfologică, cunoscută sub denumirea de ciclu "L"[1]. In cursul acestui ciclu iau naştere forme gigante, globuloase, care se pot fragmenta în formaţiuni corpusculare sau granulare de dimensiuni foarte mici (forme filtrabile), din care pot rezulta ulterior forme bacteriene cu aspect normal sau forme globuloase noi (fig.2).

2.2. MOD DE GRUPARE. La cele mai multe specii bacteriene, celulele rezultate din diviziune se separă, răspîndindu-se neuniform în mediu. In cazul unor bacterii acestea rămîn însă ataşate una de alta, de o manieră care duce la formarea de grupări caracteristice. Ca urmare, modul de grupare constituie la unele specii un important criteriu taxonomic, de mare utilitate în lucrările de diagnostic. De exemplu, la clasificarea cocilor se ia în considerare, în primul rînd, modul de grupare, aceasta fiind caracteristic fiecărui gen.

Cauzele care determină constituirea de grupări caracteristice sînt multiple. Intervine, în primul rînd, felul în care se realizează diviziunea celulelor bacteriene,

---

1) Procesele de variabilitate morfologică din ciclul "L" au fost identificate prima dată la Streptobacillus moniliformis, de către cercetătoarea Klieneberger, care a lucrat la Institutul "Lister". Denumirea de forme "L" a fost dată în cinstea institutului în care acestea au fost identificate.

aceasta producîndu-se la unele specii totdeauna pe anumite planuri şi direcţii determinate genetic.Celule rezultate din mai multe diviziuni succesive pot rămîne ataşate una de alta formînd astfel grupări caracteristice. Menţinerea lor ataşată se realizează în majoritatea cazurilor printr-o substanţă vîscoasă. Aceasta este secretată la unele specii numai pe anumite zone de la suprafaţa bacteriei, determinate genetic, ceea ce condiţionează direct maniera caracteristică de grupare a germenilor respectivi.

Cele mai caracteristice modalităţi de grupare sînt întîlnite la coci (fig.3).

2.2.1. DIPLOCOCII (diplos = dublu). Sînt coci grupaţi cîte doi. Gruparea este determinată de faptul că fiecare celulă bacteriană se divide totdeauna pe un singur plan, iar celulele fiice rămîn în continuare ataşate, realizîndu-se astfel grupări de cîte două celule sau înlănţuiri scurte de asemenea diplococi.

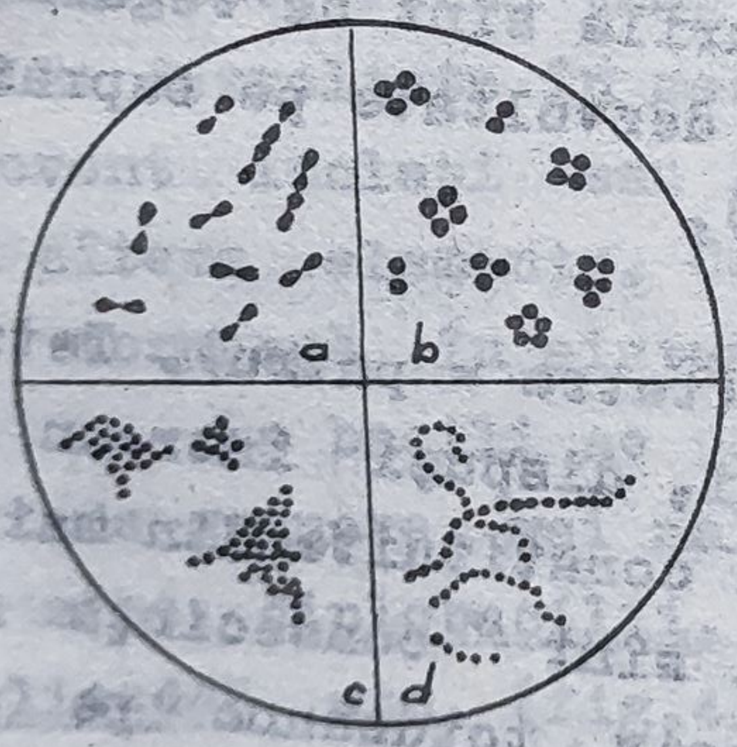


Fig.3.- Grupare de coci:
a-diplococi
b-tetrade
c-stafilococi
d-streptococi

La unele specii, aranjamentul faţă în faţă a celor doi coci se face de o maniferă foarte caracteristică. De exemplu, Str.pneumoniae (pneumococul)are o formă lanceolată şi se dispune totdeauna cu partea ascuţită faţă în faţă, iar Neisseria gonorrhoeae (gonococul) are formă reniformă şi se dispune totdeauna cu partea reniformă faţă în faţă.

2.2.2. Streptococii (streptos = lanţ). Sînt coci dispuşi într-o înşiruire liniară, asemănătoare unui şirag de mărgele. Gruparea în lanţ este determinată de

faptul că toate celulele se divid pe acelaş plan şi într-o singură direcţie, rămînînd apoi ataşate una de alta.

Cocii care se grupează în acest fel formează în sistematică genul Streptococcus.

Lungimea lanţurilor variază în anumite limite de la o specie la alta: unii streptococi se grupează frecvent în lanţuri lungi, formate adeseori din cîteva zeci de coci, în timp ce alţii se grupează obişnuit în lanţuri mai scurte, formate uneori numai din cîteva celule. Lungimea lanţurilor este în parte condiţionată de mediul în care au fost cultivaţi germenii şi de natura materialului patologic. De exemplu, Streptococcus equi, care produce gurma la cal, se găseşte în puroiul recoltat din abcesele gurmoase sub formă de lanţuri foarte lungi. Din contră, în sîngele şi organele animalelor moarte de septicemie streptococică, se întîlnesc obişnuit coci izolaţi sau grupări constituite dar din cîteva elemente. In culturile pe medii lichide lanţurile sînt de regulă mult mai lungi, decît în culturile dezvoltate pe suprafaţa mediilor semilichide (geloză cu ser).

2.2.3. <u>Gruparea în tetradă</u> (tetra = patru). Tetrada este o grupare de cîte patru coci, dispuşi într-un aranjament regulat (sau în grămezi constituite din mai multe tetrade). Asemenea formaţiuni sînt consecinţa faptului că germenii se divid succesiv totdeauna pe două planuri perpendiculare, rămînînd apoi ataşaţi în grupări de patru sau multiplu de patru. Speciile care se grupează în acest mod formează în sistematică genul Tetragenus.

2.2.4. <u>Gruparea în octadă</u>. Se caracterizează prin constituirea de grupări formate din opt coci, dispuşi într-un aranjament cubic regulat: patru într-un prim

plan şi alţi patru într-un plan profund şi simetric. Formarea de octade este determinată de faptul că diviziunea celulelor se produce succesiv totdeauna pe trei planuri perpendiculare, orientate în cele trei direcţii ale spaţiului. Speciile care se grupează în acest mod formează în sistematică genul Sarcina.

2.2.5. Gruparea în grămezi neregulate. Este caracteristică stafilococilor (staphylos = ciorchine), care se grupează în grămezi neregulate, mai mari sau mai mici, asemănătoare unor ciorchini de strugure. Gruparea este determinată de faptul că celulele se divid pe diverse planuri şi direcţii, rămînînd apoi ataşate în grămezi fără un aranjament caracteristic.

Mărimea grămezilor variază în raport cu mediul în care germenii au fost cultivaţi. In frotiurile făcute din culturile dezvoltate pe suprafaţa gelozei germenii se găsesc grupaţi în grămezi mai mari şi foarte caracteristice, în timp ce în frotiurile făcute din culturile dezvoltate în medii lichide, germenii se găsesc frecvent izolaţi sau în grămezi mici, constituite dosr din cîteva elemente. Cocii care se grupează în acest mod formează în sistematică genul Staphylococcus.

La bacili se pot întîlni de asemenea, modalităţi de grupare mai mult sau mai puţin caracteristice cum sînt: diplobacilii, streptobacilii, gruparea în "palisadă" etc. (fig.4).

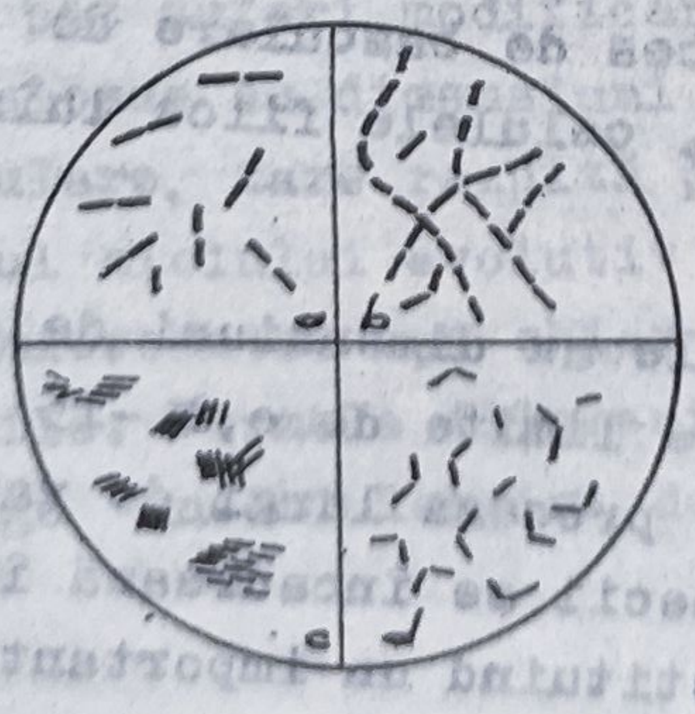


Fig.4.- Gruparea de bacili:
a-diplobacili
b-streptobacili
c-palisadă
d-grupare în v.

2.2.6. Diplobacilii sînt grupări formate din cîte doi bacili dispuşi cap la cap. Aranjamentul este dat de faptul că cele două celule rezultate din diviziune continuă să rămînă de regulă ataşate una de alta. În cazul bacilului rujetului formaţiunile diplobacilare au aspect caracteristic, germenii dispunîndu-se de regulă în unghi obtuz, asemănător literei V.

2.2.7. Streptobacili sînt grupări constituite din mai mulţi bacili dispuşi cap la cap, într-un aranjament liniar, formînd astfel o înşiruire de germeni în lanţ. Lungimea lanţurilor este variabilă, în funcţie de mediul în care germenii au fost cultivaţi sau de materialul patologic în care se găsesc. Acest mod de grupare este caracteristic pentru Bacillus anthracis, care în culturile pe medii artificiale se găseşte frecvent dispus în lanţuri uneori foarte lungi. Din contră în froturile făcute din sîngele şi organele animalelor moarte de antrax, germenii se găsesc izolaţi sau grupaţi în lanţuri scurte, formate din cel mult cîteva elemente.

2.2.8. Gruparea în "grilaj" sau "palisadă" este întîlnită la germenii din genurile Mycobacterium şi Corynebacterium, fiind caracterizată prin dispunerea mai multor bacili într-un aranjament paralel, asemănător degetelor de la o mănuşă sau a scîndurilor dintr-un gard. Aranjamentul este dat de faptul că bacilii rezultaţi din diviziuni succesive suferă un proces de basculare de 180° în jurul peretelui de septare, celulele fiice luînd astfel o poziţie paralelă.

2.3. DIMENSIUNILE. Bacteriile au dimensiuni de ordinul micrometrilor, cuprinse între limite de 0,1 -15 micrometri. Deşi sînt supuse unor procese largi de variabilitate, dimensiunile fiecărei specii se încadrează în limitele determinate genetic, constituind un important

criteriu de diagnostic. De exemplu, diametrul celor mai mici coci oscilează în jurul a o,6 micrometri,iar la cocii mari în jurul a 1,2 - 1,5 micrometri (stafilococii o,8 -1; streptococii o,6 - 1).

La bacili se apreciază lungimea şi grosimea. Cei mai mici bacili, cum sînt cei din genul Brucella, au grosimea în jurul a o,1 micrometri şi lungimea în jurul a o,3 micrometri, dimensiunile lor fiind apropiate de limita vizibilităţii cu microscopul optic. De asemenea, la Mycoplasme şi Rickettsii,formele cocobacilare sau granulare au dimensiuni foarte mici de o,1 - o,2 micrometri. La Mycobacterium tuberculosis grosimea oscilează între o,3 - o,6 micrometri, iar lungimea între o,5 - 4 micrometri; la Clostridium tetanic între o,4 - o,6/4-8 micrometri; la B.anthracis între 1 - 1,3 /3-1o micrometri (lungimea medie este de 6 - 8 micrometri, apropiată de diametrul globulelor roşii). Una din cele mai mari specii bacteriene patogene este Clostridium septicum, dimensiunile medii fiind de 1/1o micrometri. Intre bacteriile de putrefacţie se întîlnesc germeni şi mai mari; de exemplu Clostridium putrefaciens are o lungime de pînă la 15 micrometri.

Spirochetele au o grosime mică, dar o lungime apreciabilă. De exemplu, Leptospira are grosimea de o,25-o,3 micrometri, iar lungimea variază între 6-2o micrometri.

In cursul unor procese de variabilitate dimensiunile pot suferi modificări importante. Formele aberante, globuloase au dimensiuni gigante, în timp ce formele granulare, care rezultă prin fragmentarea acestora în cursul ciclului evolutiv (L), au dimensiuni în jurul a o,1 micrometri şi chiar mai mici, fiind de regulă filtrabile. Formele filamentoase ale unor bacterii pot atinge uneori lungimi de cîteva zeci de micrometri.

2.4. <u>VOLUMUL, GREUTATEA SI DENSITATEA</u>. In raport cu dimensiunile pe care le au, volumul şi greutatea sînt foarte mici. De exemplu, un coc mare, cu diametrul de 1,2 micrometri, are un volum de 10^{-12} cm^3 şi o greutate de 1,1 x 10^{-12} g; E.coli, cu dimensiuni de 0,8/2 micrometri, are un volum de 10^{-12} cm^3; Salmonella typhosa are un volum de 7,7 x 10^{-13} cm^3 şi o greutate de 0,8 x 10^{-13} g

Densitatea bacteriilor oscilează de regulă în jurul a 1,1. De aceea ele sedimentează cînd sînt suspendate în medii lichide cu o densitate mai mică. Această caracteristică este şi ea supusă variabilităţii naturale. De exemplu, B.subtilis, care este un germen strict aerob, cultivat în bulion are o densitate sub 1 (între 0,7 - 0,9) ceea ce îi permite să se dezvolte sub formă de peliculă la suprafaţa mediului lichid. Acelaşi germen cultivat pe suprafaţa gelozei are o densitate mai mare de 1. Exemplul dat arată posibilitatea de variabilitate adaptivă a densităţii celulei bacteriene, în funcţie de condiţiile de viaţă oferite de mediu.

2.5. <u>AFINITATI TINCTORIALE</u>. Bacteriile manifestă o aviditate pronunţată pentru coloranţii bazici: albastru de metilen, albastru de toluidină, cristal violet, fuxină bazică etc. Procesul de colorare se caracterizează printr-o fixare rapidă, intensă şi uniformă a colorantului, celulele bacteriene apărînd colorate de regulă omogen. Din această cauză, prin mijloacele uzuale de colorare şi investigaţie optică, în celula bacteriană nu se poate evidenţia prezenţa unor organite citoplasmatice sau a aparatului nuclear.

Nu toate speciile bacteriene se comportă însă identic faţă de aceiaşi coloranţi şi metode de colorare, mai ales în privinţa intensităţii cu care fixează şi reţin coloranţi utilizaţi. Aceste deosebiri de comportament sînt definite ca <u>afinităţi tinctoriale</u>.

Metodele de colorare prin care sînt evidenţiate afinităţile tinctoriale ale bacteriilor sînt, în esenţă, veritabile mijloace de investigaţie citochimică. Prin mijlocirea lor, lumea bacteriană poate fi împărţită în mai multe grupe, fapt de o importanţă deosebită în taxonomie, precum şi în lucrările curente de identificare a speciilor bacteriene.

Pentru evidenţierea principalelor afinităţi tinctoriale ale bacteriilor sînt utilizate de regulă două metode de colorare: metoda Gram şi metoda Ziehl-Neelsen. In scopul evidenţierii unor caracteristici tinctoriale particulare ale unor specii se recurge şi la alte metode speciale de colorare.

Metoda de colorare Gram permite împărţirea lumii bacteriene în două mari categorii: bacterii Gram pozitive, care se colorează în albastru şi bacterii Gram negative care se colorează în roşu .

Metoda de colorare Ziehl - Neelsen, utilizată pentru punerea în evidenţă a bacteriilor acido-rezistente (M.tuberculosis, M.paratuberculosis, M.leprae etc.), împarte lumea bacteriană, de asemenea, în două categorii "bacterii acido-alcoolo-rezistente, care se colorează în roşu şi bacterii neacido-alcoo-rezistente, care se colorează în albastru.

Evidenţierea acestor afinităţi tinctoriale are o mare utilitate practică, în lucrările curente de identificare a bacteriilor, dar are totodată şi o profundă semnificaţie taxonomică, între grupele de bacterii cu afinităţi tinctoriale diferite existînd, de fapt, numeroase alte caracteristici distinctive. De exemplu, majoritatea bacteriilor Gram pozitive sînt mult mai sensibile la acţiunea toxică a coloranţilor bazici de anilină (cristal violet) ,precum şi la penicilină şi alte cîteva antibiotice, în timp ce bacteriile Gram negative au o rezistenţă naturală remarcabilă faţă de acestea.

Se poate conchide că între bacteriile cu afinităţi tinctoriale diferite există numeroase deosebiri fundamentale în privinţa structurii şi organizării lor morfochimice.

Cauzele care determină gram -pozitivitatea şi gram-negativitatea sînt multiple, procesul de colorare a celulei bacteriene fiind în esenţă un fenomen fizic şi colido-chimic complex. Aviditatea diferită faţă de acelaşi colorant este determinată în parte de deosebirile de pH ale mediului endocelular; bacteriile Gram-negative au un pH endocelular în jurul a 5, în timp ce pH-ul endocelular al bacteriilor Gram-pozitive este în jurual a 2, ceea ce face ca acestea să manifeste o aviditate mai mare faţă de violetul de genţiana.

In determinarea afinităţilor tinctoriale intervin însă şi alţi factori legaţi de natura componentelor endocelulare şi mai ales de deosebirile de structură morfochimică ale pereţilor celulari şi ale membranei citoplasmatice.

Natura deosebit de complexă a fenomenului de colorare este relevată în primul rînd de constatarea că gram-pozitivitatea ţine în măsura considerabilă de starea fiziologică a celulelor bacteriene. Celulele tinere manifestă aviditatea cea mai mare faţă de colorant, dar pe măsură ce îmbătrînesc îşi pierd în parte afinităţile tinctoriale caracteristice, devenind treptat Gram-labile. Un rol important în conferirea gram-pozitivităţii revine însă structurilor parietale ale celulei, această proprietate fiind determinată de prezenţa ribonucleatului de magneziu în straturile parietale, cît şi de structura mai densă şi mai compactă a peretelui bacteriilor Gram -pozitive. Participarea ribonucleatului de magneziu în conferirea gram-pozitivităţii este atestată de constatarea că extragerea sa, prin tratarea bacteriilor cu săruri biliare, duce la pierderea proprietăţii.

In privinţa rolului pe care îl are peretele celular, o dovadă în acest sens o constituie faptul că protoplaştii bacteriilor Gram-pozitive (formaţiuni lipsite de perete bacterian) au afinităţi tinctoriale Gram-negative.

Peretele bacteriilor Gram-pozitive se comportă deci ca o barieră care se opune şi stînjeneşte decolorarea celulei prin alcool-acetonă.

Pe de altă parte se admite că între violetul de genţiana, iod (sol.Lügol) şi componentele endocelulare ale bacteriilor Gram-pozitive se formează complexe macromoleculare mai mari şi mai stabile, decît în cazul bacteriilor Gram-negative. Datorită structurii mai compacte a peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive, aceste complexe nu pot fi extrase cu uşurinţă. In conferirea gram-pozitivităţii intervine apoi şi faptul că peretele opune totodată rezistenţă la pătrunderea în celulă a alcoolului acetonă, care acţionează ca decolorant. Din contră la bacteriile Gram-negative , peretele celular este mult mai bogat în lipide şi mai puţin dens, ceea ce permit pătrunderea rapidă şi intensă a decolorantului şi, implicit , extragerea cu uşurinţă a colorantilor.

Tot unor deosebiri de structură morfo-chimică a peretelui celular se datoreşte şi acido-alcoolo-rezistenţa. Penetraţia mai dificilă a colorantului în celulă şi rezistenţă la decolorare cu acizi diluaţi şi alcool se datorează ceridelor şi lipoproteinelor existente în cantităţi mari în peretele celular al bacteriilor acido-rezistente. Un rol esenţial se pare că îl au mai ales complexele lipido-proteice, în structura cărora intră acidul micolic. Lipidele celulare permit o mai bună şi mai intensă solubilizare a colorantului fenicat. Procesul ar consta în esenţă în faptul că, fuxina fenicată ar fi legată mai intens de constituienţii celulari, fenolul

fiind mai solubil în lipidele celulare, decît în apă. Aceasta face ca bacteriile acido-rezistente, ale căror structuri parietale sînt deosebit de bogate în componente lipidice, să reţină intens fuxina fenicată.

. In concluzie, se poate spune că afinităţile tinctoriale ale bacteriilor au o profundă semnificaţie biologică, iar metodele de colorare utilizate sînt veritabile mijloace de investigaţie citochimică, de mare utilitate practică.

2.6. STRUCTURA CELULEI BACTERIENE

Examinată la microscopul optic, celula bacteriană se prezintă ca o formaţiune omogenă, aparent lipsită de o structură şi o organizare internă. De aceia, mult timp s-a considerat că ea este constituită doar dintr-un perete (membrană), care delimitează un conţinut nediferenţiat de structuri, format dintr-un amestec de materie citoplasmatică şi cromatică (nucleară). Perfecţionarea mijloacelor de investigaţie a permis însă elucidarea acestor aspecte, stabilindu-se că celula bacteriană are totuşi o structură şi organizare internă similară celulelor vegetale şi animale, dar mult mai puţin diferenţiată şi evoluată.

Cunoaşterea infrastructurii şi organizării celulei bacteriene reprezintă, prin urmare, o cucerire a microbiologiei moderne. O constribuţie esenţială în acest domeniu au adus-o cercetările de <u>microscopie electronică</u>, precum şi punerea la punct a unor tehnici de mare fineţe şi precizie: <u>microdisecţia şi secţionarea ultrafină</u> a bacteriilor. Natura chimică şi rolul diferitelor componente structurale au fost elucidate apoi prin investigaţii migăloase de <u>citochimie</u>, <u>citoenzimologie</u> şi de <u>citogenatică</u>. Prin coroborarea tuturor datelor s-a obţinut o imagine cvasicompletă asupra struc-

turii şi infrastructurii celulei bacteriene, ceea ce a permis definirea bacteriilor ca vieţuitoare cu organizare endocelulară de tip procariot.

Structura celulei bacteriene este, în ansamblu, mult mai puţin diferenţiată şi evoluată, în comparaţie cu a celulelor eucariote. Cîteva din caracteristicile fundamentale distinctive sînt redate sintetic în tabelul alăturat. De altfel, vieţuitoarele cu organizare endocelulară procariotă sînt situate pe o treaptă evolutivă inferioară vieţuitoarelor eucariote, între ele nefiind identificate forme de tranziţie. Aceasta permite să se considere că între cele două tipuri de organizare endocelulară - procariotă şi eucariotă -exsită o "prăpastie" imensă, apreciată ca cea mai mare discontinuitate evolutivă cunoscută pînă în prezent (STANIER, 1966).

Tabel 1

privind cîteva caracteristici fundamentale distinctive între celulele procariote şi eucariote (după STANIER şi colab., 1966).

Caracteristici distinctive fundamentale.	Celule procariote (bacterii şi alge albastre)	Celule eucariote (protozoare, ciuperci microscopice, majoritatea algelor, plante, animale).
Organizarea şi structura materiei citoplasmatice.	aparent omogenă, fără o structură propriu-zisă.	bine structurată, cu reticul endoplasmatic.
Curenţi şi mobilitate citoplasmatică	-	+ sau -
Mitocondrii	-	+
Structura şi organizarea nucleului	Nucleoid fără organizare internă, lipsit de nucleol şi de membrană nucleară.	Nucleul bine diferenţiat morfostructural, cu organizare internă, nucleoli şi membrană nucleară.

Tabel 1 (continuare)

Diviziunea nucleară	amitotică	mitotică
Organizarea genetică	haploidă	diploidă
Numărul cromozomi	1	2 sau multiplul de 2 (2^n)
Fenomene de dominanţă şi recesivitate a caracterelor	Nu	De

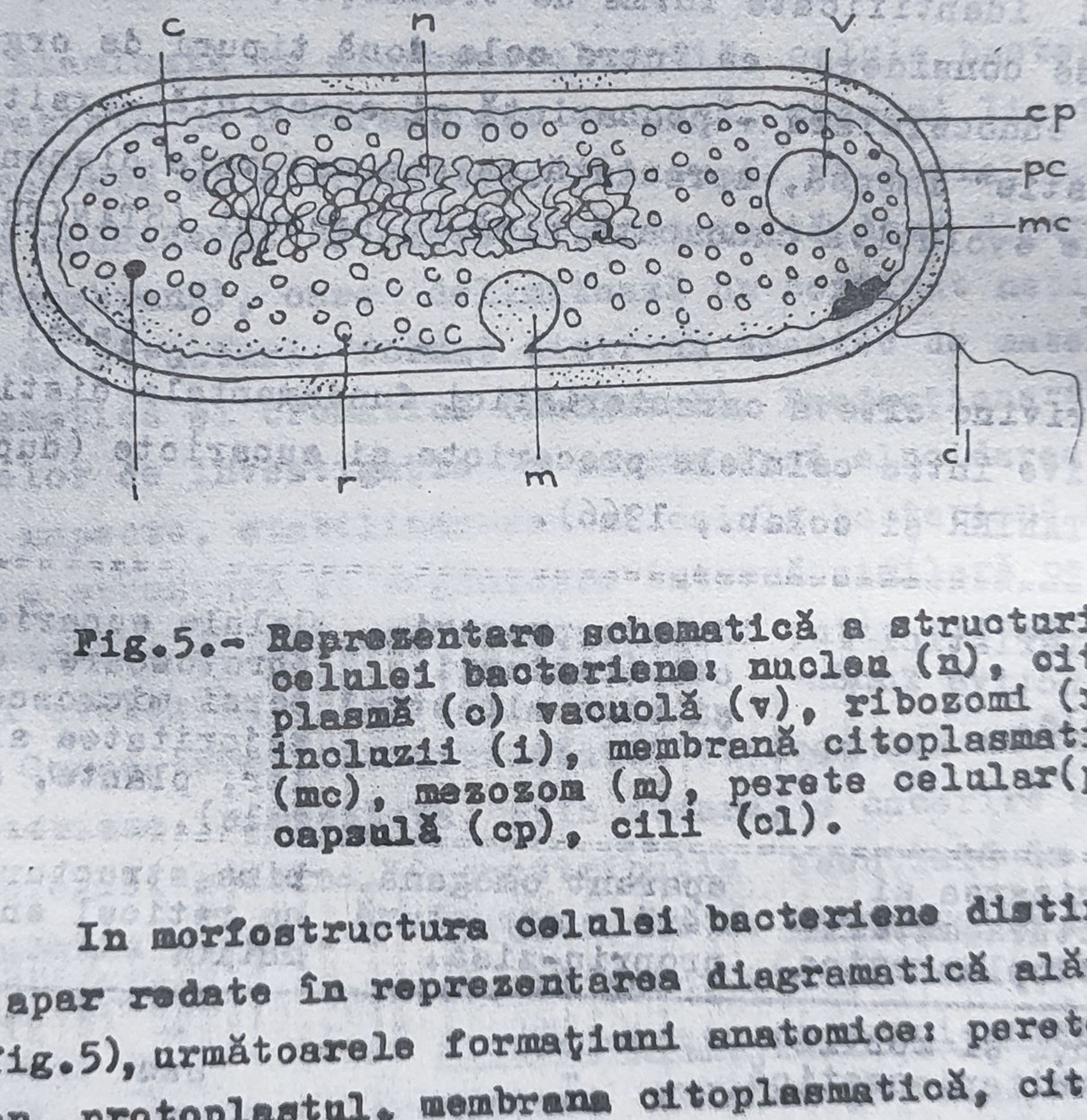


Fig.5.- Reprezentare schematică a structurii celulei bacteriene: nucleu (n), citoplasmă (c) vacuolă (v), ribozomi (r), incluzii (i), membrană citoplasmatică (mc), mezozom (m), perete celular(pc), capsulă (cp), cili (cl).

In morfostructura celulei bacteriene distingem, aşa cum apar redate în reprezentarea diagramatică alăturată (fig.5), următoarele formaţiuni anatomice: peretele bacterian, protoplastul, membrana citoplasmatică, citoplasma cu ribozomi, aparatul nuclear, precum şi organitele celulare prezente numai la unele specii bacteriene (pili, cili, capsulă etc.)

2.6.1. PERETELE CELULEI BACTERIENE (MEMBRANA)

Celula bacteriană este protejată la exterior de un perete sau membrană celulară, o formaţiune anatomică bine individualizată morfologic şi chimic, relativ compactă, rigidă şi foarte rezistentă. Deşi existenţa peretelui a fost întrevăzută încă de COHN (1872), evidenţierea sa a devenit posibilă abia odată cu perfecţionarea mijloacelor de investigaţie citochimică, enzimologică şi electronooptică.

Cunoaşterii infrastructurii sale şi a organizării morfochimice i-a acordat un mare interes. In acest sens, cercetările au relevat că de organizarea şi natura componentelor parietale depinde, în mare măsură, comportamentul bacteriilor faţă de numeroşi factori fizico-chimici şi biologici. In procesul de conflict cu organismele animale, componentele parietale de suprafaţă ale celulei bacteriene sînt primele care vin în contact cu multitudinea factorilor umorali şi celulari de apărare, pe care organismul îi opune agresiunii microbiene. De altfel, unele componente parietale acţionează ca veritabili factori de patogenitate. De exemplu, lipopolizaharidele din peretele bacteriilor Gram-negative sînt componente toxice (endotoxine) şi au rol în patogenitate, dar totodată au şi efect antifagocitar, asigurînd protecţia germenilor faţă de fagocite. Pe de altă parte, numeroase componente parietale sînt antigenice sau intră în structura antigenilor de suprafaţă, identificarea lor fiind de mare importanţă în lucrările de taxonomie şi de diagnostic a multor specii bacteriene.

Acestea sînt doar cîteva din considerentele pentru care s-a acordat o atenţie deosebită cunoaşterii naturii şi organizării peretelui bacterian.

2.6.1.1. Mijloace de investigaţie. Peretele bacterian poate fi pus în evidenţă numai prin mijloace speciale de investigaţie.

Prin unele mijloace fizice, în special mecanice, se poate realiza fisurarea, spargerea sau secţionarea peretelui, fără ca structura sa să sufere alterări esenţiale. Celulele al căror perete a fost lezat mecanic se sparg prin explozie osmotică, iar conţinutul se scurge şi se dispersează în mediu. Se pot obţine astfel fragmente de perete sau chiar pereţi bacterieni aproape întregi, care păstrează forma celulei şi apar ca nişte "umbre" sau "saci" goliţi de conţinut. Prin centrifugare, aceştia se pot separa de restul componentelor celulare, ceea ce face posibilă cercetarea lor în bune condiţiuni. Dintre procedeele mecanice utilizate menţionăm:

- triturarea bacteriilor în prezenţă de perle de sticlă, în agitator cu o frecvenţă mare de vibraţii (5ooo vibraţii/minut);

- fisurarea peretelui bacterian cu ultrasunete (procedeul nu poate fi aplicat la cocі, al căror perete rezistă la ultrasunete);

- spargerea celulei bacteriene prin congelări şi decongelări repetate (metodă utilizată în special la pneumococi);

- secţionarea ultrafină a peretelui prin microdisecţie sau executarea de secţiuni ultrafine prin celula bacteriană şi examinarea la microscopul electronic.

Un rol important în cunoaşterea naturii chimice a peretelui bacterian l-au avut mijloacele de investigaţie citochimică. De exemplu, digestia triptică a bacteriilor, încălzite în prealabil la 75°, a permis obţinerea de pereţi bacterieni într-un grad avansat de purificare. Prin tratarea cu alcali şi acizi (acid tricloracetic) sau prin utilizarea unor coloranţi din seria sudanului (care evidenţiază specific lipidele) etc. s-a

reuşit extragerea, respectiv identificarea unor componente chimice.

Date deosebit de valoroase au fost obţinute prin investigaţii citoenzimologice fiind utilizate în acest scop lizozima (enzimă cu rol de glucidază), precum şi anumite enzime cu proprietăţi autolitice, extrase chiar din unele celule bacteriene (de exemplu, Bacillus anthracis sintetizează asemenea enzime capabile să lizeze peretele celular îndată ce germenii sporulează).

Date importante au fost furnizate şi de unele antibiotice (penicilina ,lizostafina, cicloserina etc.) care acţionează asupra peretelui fie prin lezarea unor componente structurale (de exemplu, a "mureinei"), fie prin interferarea biosintezei acestora.

In studiul peretelui bacterian au fost amplu utilizate mijloacele optice şi electronooptice. Microscopul optic permite visualizarea peretelui numai dacă acesta este colorat prin metode speciale (cu eozinat de albastru de metilen, albastru alcian, verde de Iannus, coloranţi din seria Sudanului etc.). Prin microscopia în cîmp întunecat peretele apare sub forma unui strat fin şi luminos, mai distinct şi mai clar la celulele bacteriene care au fost în prealabil supuse unor procese de plasmoliză, prin menţinerea lor în soluţii puternic hipertonice. In aceste condiţii, conţinutul endocelular pierde apă şi se retractă, împreună cu membrana citoplasmatică, care se desprinde de perete.

Un aport deosebit în cunoaşterea infrastructurii peretelui bacterian l-a adus microscopia electronică. Examenele electrooptice au fost efectuate pe pereţii celulari izolaţi (obţinuţi prin dezintegrarea bacteriilor prin mijloace mecanice) şi pe secţiuni ultrafine executate prin celula bacteriană, preparatele fiind examinate ca atare, în stare nativă, sau după prelucrarea şi colorarea lor prin diverse procedee.

2.6.1.2. Structura morfo-chimică. Peretele bacterian este o formaţiune anatomică bine cunoscută morfo-chimic, relativ compactă, rezistentă şi rigidă.

Grosimea variază între 15 - 35 mμ, fiind de regulă mai subţire la celulele tinere. Are o grosime mai mare la bacteriile Gram- pozitive decît la bacteriile Gram-negative. Cantitatea reprezintă la unele specii pînă la 25 % din volumul celulei.

Infrastructura şi organizarea morfo-chimică sînt deosebit de complexe, cu numeroase deosebiri de la o specie sau grup de bacterii la altul. Imaginile electro-no-optice au relevat, ca o caracteristică generală, că structura fundamentală se aseamănă cu o plasă sau reţea, cu tramă şi ochiuri regulate. Aceasta apare alcătuită din fascicule cu fibre paralele care se încrucişează, formînd în jurul celulei o veritabilă reţea continuă. In alte imagini, această structură în reţea apare formată dintr-un număr foarte mare de subunităţi sferoidale, dispuse intr-un aranjament rectangular sau hexagonal. De exemplu, la Bacillus polymixa, subunităţile sferoidale au aproximativ 70 Å, fiind dispuse în reţea, în aranjament rectangular regulat, între ele existînd spaţii de cca. 30 Å. La B. megaterium porii reţelei au diametrul de cca 1o7 Å, fiind permeabili pentru componente cu o greutate moleculară pînă la 57.ooo (GHEHHARD şi JUDEGE, 1964).

Prin urmare, peretele celulei bacteriene are calitatea de membrană semipermeabilă, cu structură poroasă, care permite realizarea schimburilor active de metaboliţi celulă-mediu, în ambele sensuri.

La toate bacteriile, în structura peretelui intră un component macromolecular denumit "mureină" (sau mucocomplex, peptidoglican, mucopeptid etc.). Din punct de vedere chimic mureina este un polimer glicopeptidic, cu o configuraţie spaţială în "reţea" - bi sau

tridimensională. Acest polimer formează în jurul celulei un veritabil "sacul mureinic", a cărui rezistenţă şi rigiditate sînt consolidate prin legături covalente cu alte componente parietale.

Pe lîngă mureină, peretele conţine numeroase alte componente, de regulă proprii fiecărei specii bacteriene. Cele mai bine reprezentate cantitativ sînt: acizii teichoici (la bacteriile Gram-pozitive), complexele lipopolizaharidice (la bacteriile Gram-negative), precum şi diferite ceride, fosfolipide, glucide (aminate sau neaminate), polialcooli etc.

Prin legăturile chimice ce se stabilesc între acestea, precum şi prin legăturile covalente cu mureina, se realizează un perete celular bine organizat ca structură, relativ dens, mai mult sau mai puţin compact, care prin rezistenţa sa este capabil să asigure protecţia şi integritatea celulei bacteriene.

Prin dispunerea acestor componente în perete, ele formează în principiu două straturi:

- stratul "R" (rigid), alcătuit predominant din mureină, ocupă zona profundă a peretelui;
- stratul "plastic" format din diverse componente glucidice, lipidice şi proteice etc., specifice fiecărei bacterii, alcătuieşte structurile de suprafaţă ale peretelui, contribuind la consolidarea sa.

In privinţa structurii peretelui există însă mari deosebiri în special de la un grup de bacterii la altul.

PERETELE BACTERIILOR GRAM-POZITIVE - Este mai gros şi are o structură relativ omogenă, densă şi compactă. Consituientul predominant cantitativ este mureina, care se găseşte în zona profundă a peretelui şi poate ajunge la unele specii pînă la 80 - 90 % din greutatea uscată a componentelor parietale. Mai conţine diferite proteine şi polizaharide, precum şi

puţine lipide. Majoritatea acestor componente se găsesc spre suprafaţa peretelui, cele mai multe fiind însă legate covalent la mureină. Dintre componentele polizaharidice, cele mai caracteristice pentru bacteriile Gram-pozitive şi mai bine reprezentate cantitativ sînt: <u>acizii teichoici</u>, <u>acizii lipoteichoici</u> şi <u>acizii teichuronici</u>.

<u>Mureina</u>. Este un polimer glicopeptidic cu o configuraţie în reţea bi sau tri dimensională. (fig.6) Formează în jurul celulei un veritabil "saccul" mureinic ("murein sacculus") (fig.7). Prin rezistenţa şi rigiditatea sa, îndeplineşte pentru celula bacteriană rolul unui "citoschelet", conferindu-i totodată forma caracteristică.

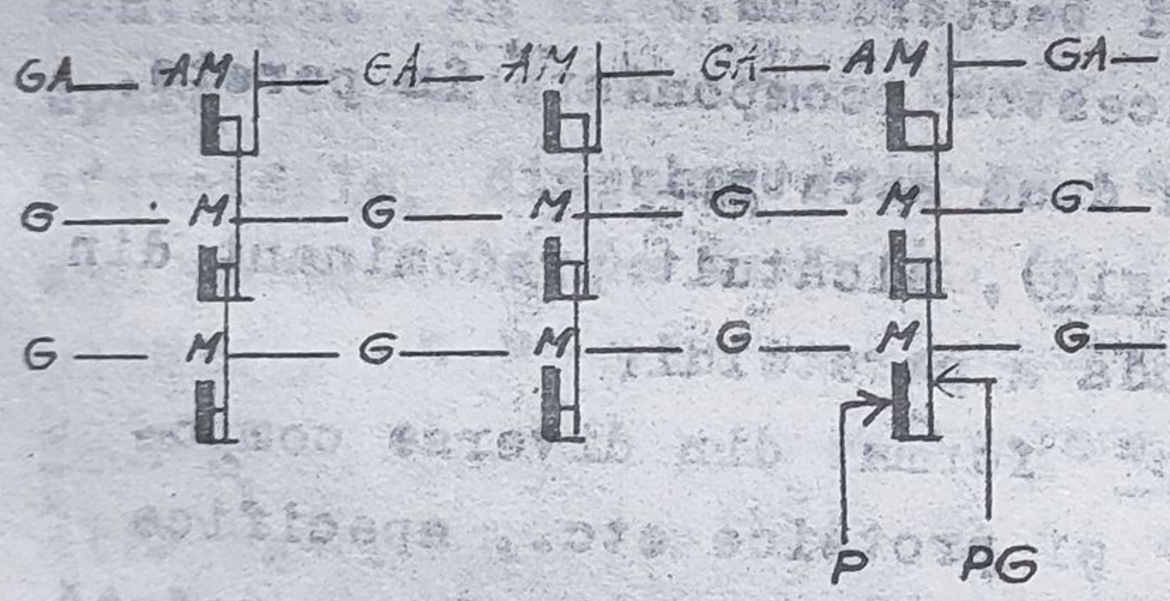


Fig.6.- Reprezentare schematică a structurii mureinei la Staph.aureus: acetil-glucozamină (GA), acid acetil muramic (AM), oligopeptidă (P), legătură covalentă pentaglicinică între oligopeptide învecinate (PG)

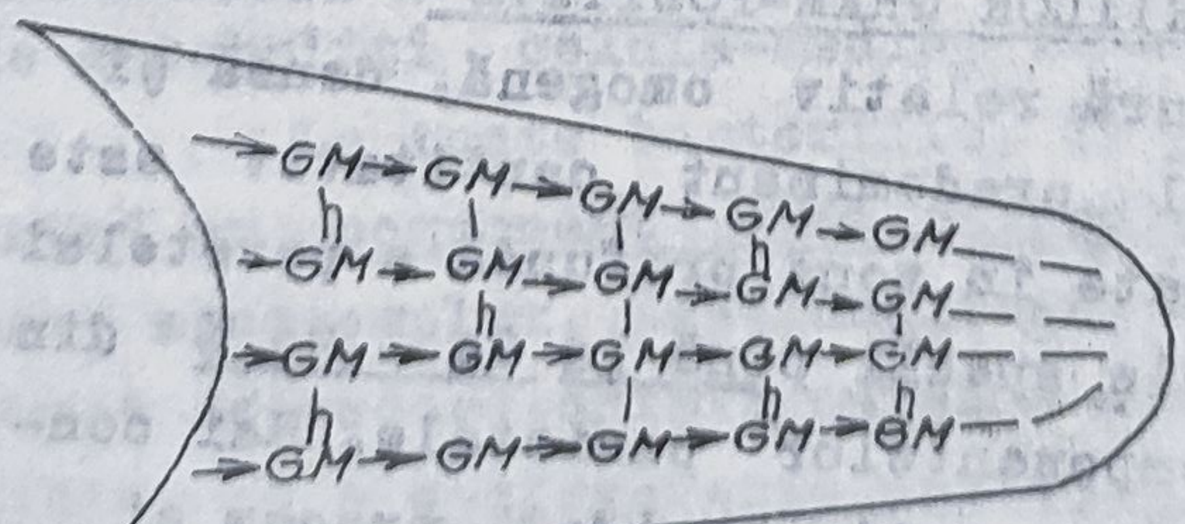
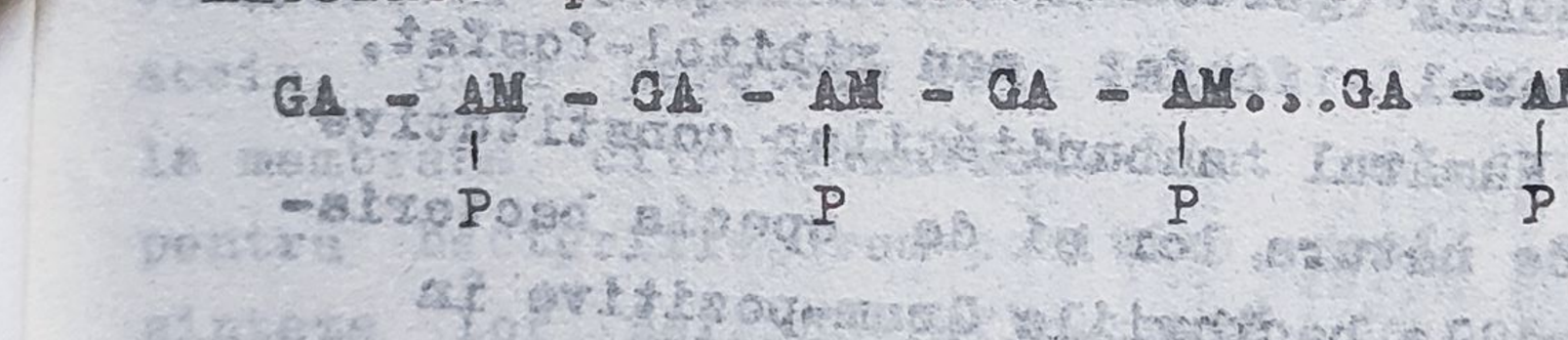


Fig.7. Model ipotetic de structură a "sacculului mureinic".

Din punct de vedere chimic, mureina este formată dintr-un polimer glucidic liniar, rezultat din condensarea alternativă a acetil-glucozaminei şi a acidului acetil-muramic. Aceasta formează scheletul macromoleculei, rezistenţa sa fiind dată de legăturile glicozidice dintre cele două componente. La acidul acetil-muramic se leagă lateral oligopeptide (tetra sau pentapeptide). Intre oligopeptidele învecinate se stabilesc legături chimice adiţionale (convalente), care consolidează rezistenţa macromoleculei.

Prin urmare, mureina este un polimer alcătuit dintr-o succesiune de monomeri mureinici (sau muropeptidici) formaţi din glucozamină - acid muramic - oligopeptid. In structura macromoleculei, acidul muramic deţine o poziţie cheie, întrucît configuraţia sa chimică îi permite stabilirea concomitentă a unor legături glicozidice cu glucozamina şi cu alte componente glucidice aminate prezente în perete, precum şi a unor legături amidice cu oligopeptidele muralitice. Structura mureinei poate fi redată schematic astfel:



La majoritatea speciilor, oligopeptidele sînt tetrapeptide formate din: L-alanina, ac. D-glutamic, L-lizina (sau ac. diaminopimelic) şi D.alanina. Legarea la acidul acetil muramic se realizează totdeauna prin L-alanină. Dintre aceşti acizi aminaţi un rol deosebit revine L-lizinei sau ac.diaminopimelic, care are 3, respectiv 4 grupări funcţionale, prin care se stabilesc legături peptidice atît cu oligopeptidele învecinate, cît şi cu alte componente perietale, conferind astfel macromoleculei o configuraţie spaţială tridimensională. La bacteriile ale căror oligopeptide

conţin acid diaminopimelic, legăturile covalente se stabilesc între aceasta şi D-alanina din oligopeptidul învecinat (situată în poziţia terminală a lanţului peptidic). In cazul oligopeptidelor care conţin L-lizină, legăturile dintre acestea se stabilesc de regulă prin intermediul unor punţi peptidice adiţionale, formate din unul sau mai mulţi acizi aminaţi. De exemplu, la Staph. aureus Copenhaga legăturile se stabilesc prin punţi pentaglicinice, la Str.termophilus şi Str.fecalis prin punţi trialaninice, la alte specii prin punţi diglicinice (M.radiodurans) sau dialaninice, iar la unele specii prin intermediul unui singur acid aminat adiţional (ac. aspartic, L-lizina). Ca urmare, deşi mureina tuturor bacteriilor este formată pe un tipar universal - ea are totuşi caracteristici proprii fiecărei specii sau chiar variante.

Majoritatea acizilor aminaţi din oligopeptide sînt dextrogiri, ceea ce se pare că are rol important în protejarea peretelui bacterian faţă de proteaze.

Acizii teichoici (gr.teichos = zid). Sînt polimeri liniari de glicerol - fosfat sau ribitol-fosfat, lungi şi flexibili. Numărul subunităţilor constitutive diferă în funcţie de natura lor şi de specia bacteriană. Se găsesc numai la bacteriile Gram-pozitive în cantităţi relativ mari, care pot ajunge la unele specii pînă la 4o - 6o % din greutatea uscată a peretelui. Cei mai frecvenţi sînt acizii poli-glicerol-fosfat.

De regulă, la grupările hidroxid ale acestor polimeri liniari se leagă alte componente chimice (D-ala, D-liz, glucoză, lactoză, N-acetilglucozamină etc.) care sînt proprii fiecărei specii. Asemenea componente îndeplinesc şi rolul de grupări determinante ale specificităţii antigenice, contribuind astfel la conferirea individualităţii chimice şi antigenice a peretelui, la fiecare specie.

Se găsesc situaţi în perete mai mult sau mai puţin profund. In raport cu poziţia şi natura lor, se disting trei categorii:

- <u>acizii teichoici parietali</u>, care sînt componente de suprafaţă legate de regulă covalent la mureină, contribuind la consolidarea structurii şi rezistenţei acesteia şi a peretelui. Se găsesc la majoritatea bacteriilor Gram-pozitive, variind cantitativ în funcţie de condiţiile de cultivare şi de mediu. La grupările hidroxid ale acestora se leagă diferite componente, formînd împreună antigenii de suprafaţă;

- <u>acizii teichuronici</u>, formaţi din unităţi dizaharidice repetate, la care se leagă covalent N-acetil-glucozamina şi acidul glucuronic. Se găsesc în perete asociaţi cu acizii teichoici;

- <u>acizii teichoici membranari sau lipotheicoici</u> sînt formaţi prin polimerizarea a 2o - 3o unităţi de glicerol - fosfat. Se găsesc situaţi în zona profundă, în aria "rău definită" dintre perete şi membrana citoplasmatică , unde formează o reţea. Sînt de regulă legaţi covalent de componentele membranei citoplasmatice. De aceia, cînd peretele este înlăturat, ei rămîn ancoraţi la membrana citoplasmatică. Sînt mai caracteristici pentru bacteriile Gram-pozitive, decît acizii teichoici, sinteza lor nefiind influenţată de condiţiile de cultivare.

Rolul acizilor teicoici este deosebit de complex, conferind bacteriilor Gram-pozitive o serie de proprietăţi. Ei protejează mureina faţă de anumite enzime şi detergenţi. De exemplu, lizozima poate leza peretele stafilococilor numai după îndepărtarea acizilor teichoici. Sînt implicaţi apoi în menţinerea, în zona de la suprafaţa membranei citoplasmatice, a unei anumite concentraţii de ioni metalici, în special de Mg^{2+}, ceea ce are o importanţă esenţială pentru activitatea unor

sisteme enzimatice membranare. Au actiune antifagocitară (la Str.pyogenes) şi pot servi ca receptori pentru fagi şi colicine (ac.lipoteichoici) etc.

PERETELE BACTERIILOR GRAM-NEGATIVE. Este mai subţire şi mai puţin rigid. Conţine mai puţină mureină, aceasta reprezentînd doar 5 - 2o % din totalul componentelor parietale. In schimb, peretele bacteriilor Gram- negative conţine cantităţi mari de lipopolizaharide, precum şi lipoproteine, fosfolipide şi alte componente.

Datorită prezentei acestor componente şi a modului în care se dispun, structura peretelui bacteriilor este mai complexă. In imaginile electronooptice pare triplustratificat. Stratul profund, electronodens (corespunzător stratului R.) are o grosime de 1,5 - 3,o nm şi este constituit predominant din mureină şi lipoproteine.Celelalte componente formează stratul plastic sau membrana externă, cu o grosime de 6 - 2o nm. Structura acesteia este deosebit de caracteristică, fiind alcătuită din lipopolizaharide (5o %), fosfolipide (35 %) şi proteine (15 %), dispuse într-un mod mai puţin precizat. Datele existente pledează însă pentru ipoteza că fosfolipidele formează un strat intern continuu, care se leagă prin lipoproteine la stratul mureinic profund. Lipopolizaharidele sînt asociate stratului extern, glucidele din complex fiind orientate spre suprafaţă, ele fiind şi purtătoare ale specificităţii antigenice.

Lipopolizaharidele (lps). Predomină cantitativ, fiind componentele caracteristice pentru structura peretelui la toate bacteriile Gram-negative. Ele au rol structural important, constituind totodată antigenii "O" şi endotoxinele bacteriilor Gram-negative, specificitatea antigenică fiind conferită de polizaharide, iar toxicitate de lipidul A conţinut de complex. Indeplinesc totodată şi rolul de receptori pentru

bacteriofagi.

Dintre componentele parietale ale bacteriilor Gram-negative, complexele lps sînt cele mai ampla studiate. Pot fi extrase din celula bacteriană prin diverse procedee. Sînt componente termostabile. Conţin în structura lor o componentă lipidică, definită ca lipid A, care se leagă cu un polizaharid care reprezintă porţiunea centrală "R" a complexului; la aceasta se leagă apoi polizaharidul "O" (fig.8).

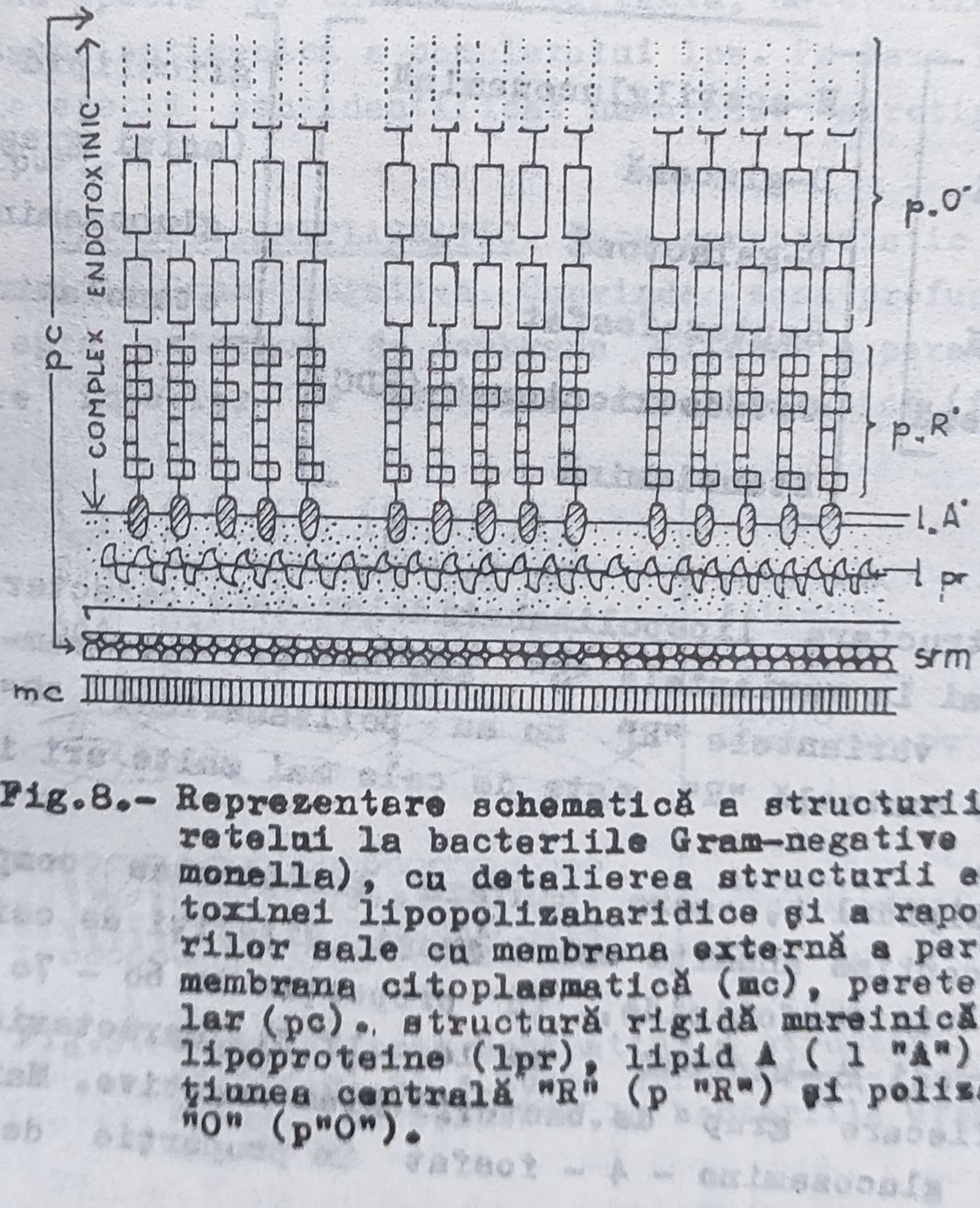


Fig.8.- Reprezentare schematică a structurii peretelui la bacteriile Gram-negative (Salmonella), cu detalierea structurii endotoxinei lipopolizaharidice şi a raporturilor sale cu membrana externă a peretelui: membrana citoplasmatică (mc), perete celular (pc), structură rigidă mureinică (srm), lipoproteine (lpr), lipid A (l "A"),porţiunea centrală "R" (p "R") şi polizaharidul "O" (p"O").

Lipidul A şi polizaharidul "R" sînt constituienţi relativ foarte asemănători la toate bacteriile Gram-negative. In schimb, polizaharidul "O" este un

component specific, fiind constituit din glucide proprii fiecărei specii, acestea fiind cele care determină specificitatea antigenilor "O".

Schematic structura complexului lps se prezintă astfel:

Polizaharid "O" - Porţiune centrală "R" (polizaharidică) - Lipidul A

D-Manoză D-Galactoză L-ramneză Deoxihexoză Dideoxihexoză	N-acetilglucozamină D-glucoză D-galactoză Heptozofosfat Cetodeoxioctonat-(KDC) Etanolamină	glicolipid (acizi graşi + glucozamină + etanolamină)

Structura lipopolizaharidelor este caracteristică numai la variantele "S" ale bacteriilor Gram-negative; variantele "R" nu au polizaharidul "O", iar porţiunea centrală "R" este de cele mai multe ori incompletă.

Lipidul A, care conferă toxicitatea complexului, conţine anumiţi acizi graşi diferiţi de cei prezenţi în fosfolipide, în proporţie de 6o - 7o % (acizi graşi β-hidroxi cu lo - 17 C), caracteristici pentru fiecare grup de bacterii Gram-negative. Mai conţine glucozamino - 4 - fosfat în proporţie de lo - 2o % şi etanolamină.

Polizaharidul "O" este alcătuit din secvenţe oligozaharidice repetate (care conţin de regulă 2-4 monozaharide), în structura cărora intră diferite monozaharide (4 -aminopentoza, maneza, ramnoza, galactoza,

2-aminohexoze, 6 disoxihexoze, 3, 6 - dideoxihexoza etc.) Dideoxihexozele sînt glucide care există în natură numai la bacterii, în polizaharidul "O" al enterobacteriaceelor, purtînd diferite denumiri după specie: tyvelozâ la S.typhi (3,6 - dideoxi - D - manoză); colitoză la E.coli (3,6-dideoxi - L - galactoză); abequoză la S.abortus; paratoză la S.paratyphi (3,6 -dideoxi -D - glucoză) etc.

Compoziţia în asemenea glucide şi secvenţa lor diferă cu specia şi chiar cu varianta, determinînd specificitatea antigenică a complexului lps. Pe baza lor, la unele specii sau identificat numeroase serotipuri şi chemotipuri.

SPATIUL PERIPLASMATIC. Este caracteristic numai la bacteriile Gram- negative. Cuprinde zona profund delimitată spre exterior de membrana externă a peretelui, iar spre interior de membrana citoplasmatică (fig.9).

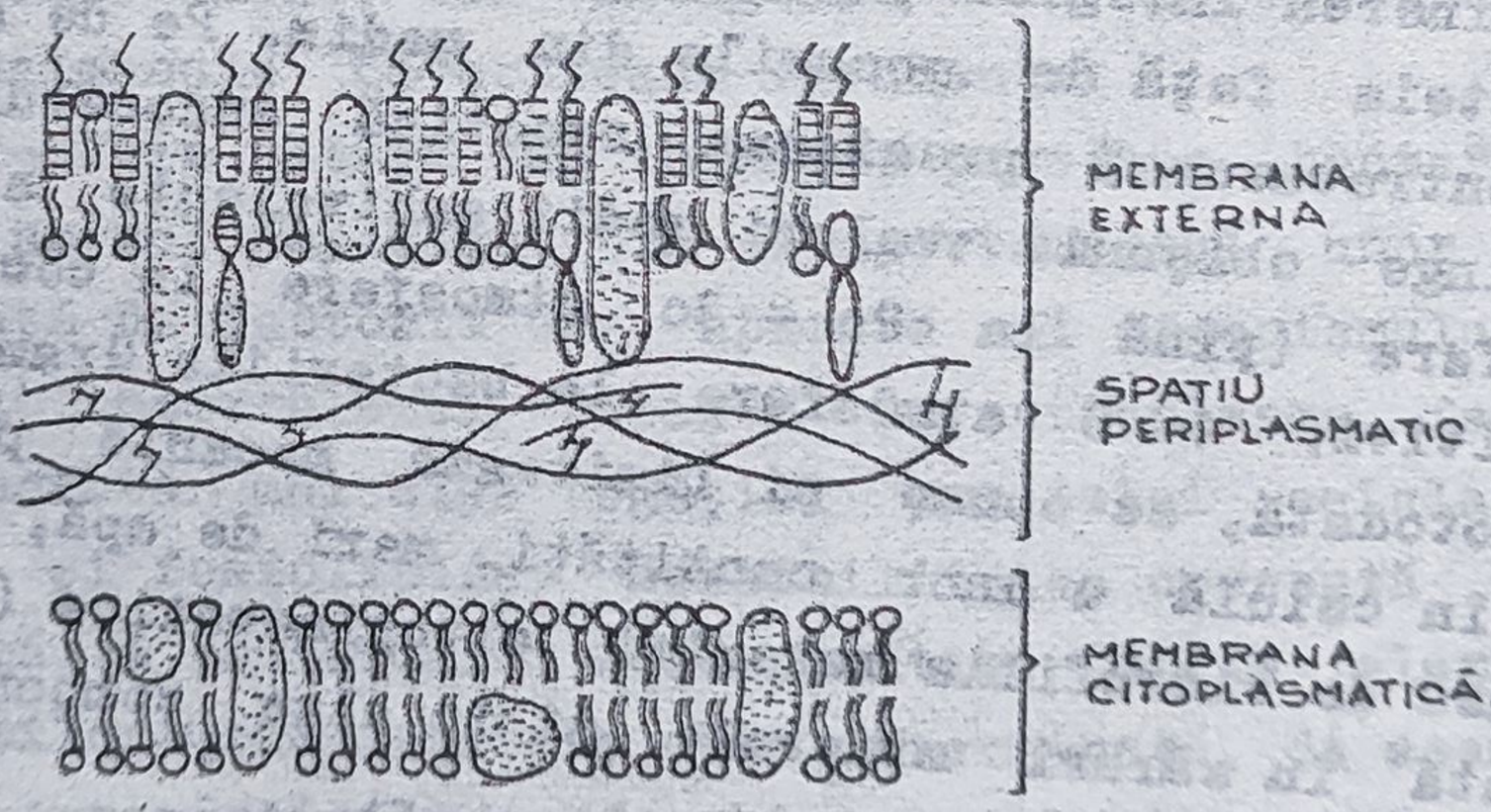


Fig.9.-Reprezentarea schematică a structurii peretelui şi a zonei care formează spaţiul periplasmic,la bacteriile Gram-negative.

Prin urmare, în spaţiul periplasmatic este cuprins şi stratul "R" al peretelui, format din mureină şi lipoproteine. În această zonă se găsesc numeroase enzime (fosfatază alcalină, acid hexozofosfatază, fosfodieste-

rază ciclică, diferite hidrolaze, fosfataze, nucleaze, penicilinaze etc.),precum şi anumite proteine neenzimatice, care au rol de a lega specific anumite componente (glucide, aminoacizi, ioni organici etc.) şi de a le transporta la membrana citoplasmatică.

2.6.1.3. Rol biologic. Deşi lipsit de enzime şi, ca urmare, inert metabolic, peretele celulei bacteriene are un rol esenţial în menţinerea integrităţii morfo -funcţionale şi în desfăşurarea activităţii vitale a bacteriei. Sintetizînd datele prezentate, merită reţinute cîteva din principalele atribute ce-i revin.

- Prin mecano-structura sa compactă, densă şi relativ rigidă, conferă bacteriilor forma caracteristică. Rezistenţa şi elasticitatea sa sînt esenţiale pentru menţinerea integrităţii celulei, asigurînd protecţia acesteia faţă de şocurile din mediu. Pe de altă parte contracarează presiunea osmotică endocelulară, care atinge obişnuit valori medii echivalente a 15-2o atmosfera (pînă la 2o - 3o atmosfere la cocii Gram-pozitivi; 4- 8 atmosfere la bacteriile Gram-negative). Totodată, se opune şi limitează mecanic pătrunderea în celulă a unor cantităţi mari de apă, puternic atrasă de hidrofilia materiei citoplasmatice (foarte bogată în săruri minerale şi în alte componente hidrosolubile).

- Structura poroasă conferă peretelui celular caracterul de membrană semipermeabilă, care permite realizarea unor schimburi continuu şi selective de metaboliţi, între celulă şi mediu. Deşi nu are rol metabolic, se admite totuşi că poate interveni în unele procese de fixare şi transport ionic.

- De anumite caracteristici str ucturale şi chimice ale peretelui bacterian depind în măsură

considerabilă afinităţile tinctoriale ale bacteriilor.

- Peretele celulei bacteriene participă în procesele de diviziune celulară; creşte centripet, septînd şi separînd complet cele două celule fiice rezultate din diviziune.

- Componentele macromoleculare parietale sînt în cele mai multe cazuri antigenice, specificitatea antigenică fiind conferită de regulă de componentele glucidice. De exemplu, lipopolizaharidele reprezintă antigenii "O" ai bacteriilor Gram-negative. Componentele antigenice parietale diferenţiază şi individualizează fiecare specie bacteriană, constituind frecvent un important criteriu taxonomic, de mare utilitate în indentificarea speciilor şi tipurilor bacteriene.

- Unele componente parietale au rol în agresivitatea germenilor, fiind considerate factori de patogenitate. De exemplu, complexele lipopolizaharidice au rol de endotoxine, iar antigenii "Vi" pe care îi au unele salmonele favorizează virulenţa:

- Prin natura sa chimică, peretele bacterian joacă un rol important în comportamentul unor bacterii faţă de factorii de apărare ai organismului. Astfel, bacilul tuberculozei rezistă în citoplasma fagocitelor datorită mai ales bogăţiei peretelui celular in ceride şi fosfolipide. Sensibilitatea crescută la lizozimă a bacteriilor Gram-pozitive şi la alexină a bacteriilor Gram-negative este determinată, de asemenea, de caracteristicile morfo-chimice ale peretelui celular.

- Anumite grupări chimice de suprafaţă (de exemplu, lipopolizaharidele bacteriilor Gram- negative) au rol de receptori pentru bacteriofagi. Acest fapt este atestat şi de constatarea că bacteriofagii nu se pot fixa pe suprafaţa protoplaştilor.

- Peretele bacterian determină comportamentul

diferit al bacteriilor la numeroşi agenţi fizico-chimici şi biologici. De exemplu, bacteriile Gram -pozitive sînt sensibile la penicilină şi mai sensibile la acizi, detersensibile la penicilină şi mai sensibile la acizi, detergenţi, iod etc., decît bacteriile Gram-negative, dar sînt mai rezistente la alcali , agenţi oxidanţi, enzime proteolotice etc.

In concluzie, se poate spune că peretele bacterian îndeplineşte numeroase funcţii, celula bacteriană putînd să-şi manifeste atributele morfo-biologice numai la adăpostul unui perete celular integru.

2.6.2. PROTOPLASTUL. Prin îndepărtarea peretelui bacterian se obţine o formaţiune bine individualizată numită protoplast. Acesta conţine toate componentele endocelulare (citoplasmă, organite citoplasmatice şi aparat nuclear), delimitate la exterior de membrana citoplasmatică. Masa protoplaştilor reprezintă aproximativ 6o -8o % din greutatea uscată a celulei bacteriene.

In mediile izotonicizate (prin adaus de zaharoză în concentraţii de o,1 - o,5 M) protoplaştii îşi conservă integritatea morfologică, luînd însă o formă izodiametrică, sferoidală, datorită forţelor osmotice endocelulare şi a elasticităţii membranei citoplasmatice. In mediile hipertonice, datorită pierderii de apă endocelulară, volumul protoplaştilor se retractă, se micşorează. Din contră, în mediile hipotonice (cum sînt cele naturale) protoplaştii se dezintegrează imediat, întrucît absorbţia rapidă de apă duce la creşterea, considerabilă a volumului şi a presiunii osmotice endocelulare, ceea ce provoacă ruperea membranei. Se produce astfel o adevărată "explozie osmotică", conţinutul celular dispersîndu-se în mediu.

Protoplaştii pot fi obţinuţi mai uşor din bacteriile Gram-pozitive, al căror perete este predominant glucidic. In acest scop se poate recurge la tratarea

bacteriilor cu lizozimă, care hidrolizează mureina şi îndepărtează peretele celular. Formaţiuni asemănătoare se pot obţine şi prin cultivarea bacteriilor în prezenţa penicilinei, antibioticul interferînd sinteza mureinei şi implicit al pretelui celular. In prezenţa antibioticului, celulele fiice rezultate din diviziune nu-şi mai pot sintetiza integral peretele, dînd astfel naştere la sferoplaşti, formaţiuni care mai păstrează resturi de perete. Datorită fragmentelor de perete rămase pe suprafaţa lor, sferoplaştii se pot multiplica şi îşi pot resintetiza peretele, procesul pornind chiar de la fragmentele rămase, care îndeplinesc probabil rolul de "starter" (de "matriţă" pentru resintetizarea "sacului mureinic").Prin aceasta sferoplaştii se deosebesc de protoplaşti, care nu-şi pot resintetiza peretele.

Protoplaştii au putut fi obţinuţi şi sub acţiunea altor factori: prin cultivarea unor bacterii în prezenţa glicinei; prin tratarea cu lizozim extras de la bacteriofagi; la B.cereus, prin dezintegrarea peretelui cu enzimele litice extrase din peretele sporal (STRANGE şi SARKE, 1957); la unele tulpini de B.anthracis prin suspendarea germenilor în soluţie Ringer (STAHLEIN, 1953,)etc.

Din bacteriile Gram- negative, al căror perete celular conţine mureină în cantităţi reduse, se pot obţine numai formaţiuni sferoplastice, întrucît peretele celular îşi conservă parţial structura predominant lipoproteică şi lipopolizaharidică.

Prin ansamblul caracteristicilor sale, protoplastul reprezintă unitatea morfo-biologică de bază a celulei bacteriene, conservînd toate atributele esenţiale ale acesteia. Astfel, în mediile izotonicizate, protoplaştii îşi menţin viabilitatea timp variabil, păstrînd toate potenţele enzimatice ale celulei, inclusiv capacitatea de a elabora enzime inductibile. Ca urmare, dacă sînt menţinuţi în condiţii convenabile de mediu,protoplaş-

tii pot desfăşura o activitate metabolică energetică şi plastică fără alterări esenţiale. De exemplu, pot sintetiza proteine şi acizi nucleici,,pot forma spori şi, mai mult, pot multiplica bacteriofagii a căror acid nucleic a fost introdus în celulă înainte de îndepărtarea peretelui etc.

Datorită conservării acestor atribute, protoplaştii pot fi consideraţi celule bacteriene lipsite de perete.

2.6.3. MEMBRANA CITOPLASMATICA. Poate fi pusă în evidenţă numai prin mijloace speciale de investigaţii. Se mulează perfect la faţa internă a peretelui, cu care are doar raporturi de contiguitate. In schimb, raporturile sînt foarte strînse cu masa citoplasmatică. Faptul este atestat de constatarea că, dacă bacteriile sînt suspendate într-un mediu puternic hipertonic survine un proces de plasmoliză, caracterizat prin pierderea de apă şi retractarea masei citoplasmatice. In cursul procesului membrana citoplasmatică se desprinde de perete,însoţind fidel conţinutul endocelular. In acest mod, la unele bacterii Gram-pozitive mari, de exemplu la B.megaterium, membrana citoplasmatică poate fi evidenţiată chiar la microscopul optic, după colorarea sa prin metode speciale care o diferenţiază de materia citoplasmatică şi de peretele bacterian.

2.6.3.1. STRUCTURA MORFO-CHIMICA. Membrana citoplasmatică este formată din lipo-proteine dispuse în dublu strat fin, subţire, colorabil, cu o grosime între 7,5 - 10 nm. Are o densitate superioară materiei citoplasmatice şi o mare elasticitate.

Electrono-optic apare ca o formaţiune triplu stratificată, alcătuită din două straturi electrono-opace separate de un strat median electrono-transparent.

Acest aspect este dat de faptul că matricea membranei citoplasmatice este formată din fosfolipide dispuse în strat dublu, moleculele lor avînd o structură complexă, cu o extremitate polară hidrofilă şi alta hidrofobă. Ele sînt dispuse în stratul dublu lipidic de o manieră caracteristică, cu extremităţile polare hidrofobe orientate spre interior, respectiv faţă în faţă, acestea formînd stratul median electrono-transparent; extremităţile ionice hidrofile, orientate spre exterior, formează cele două straturi electrono-cpace (fig.1o).

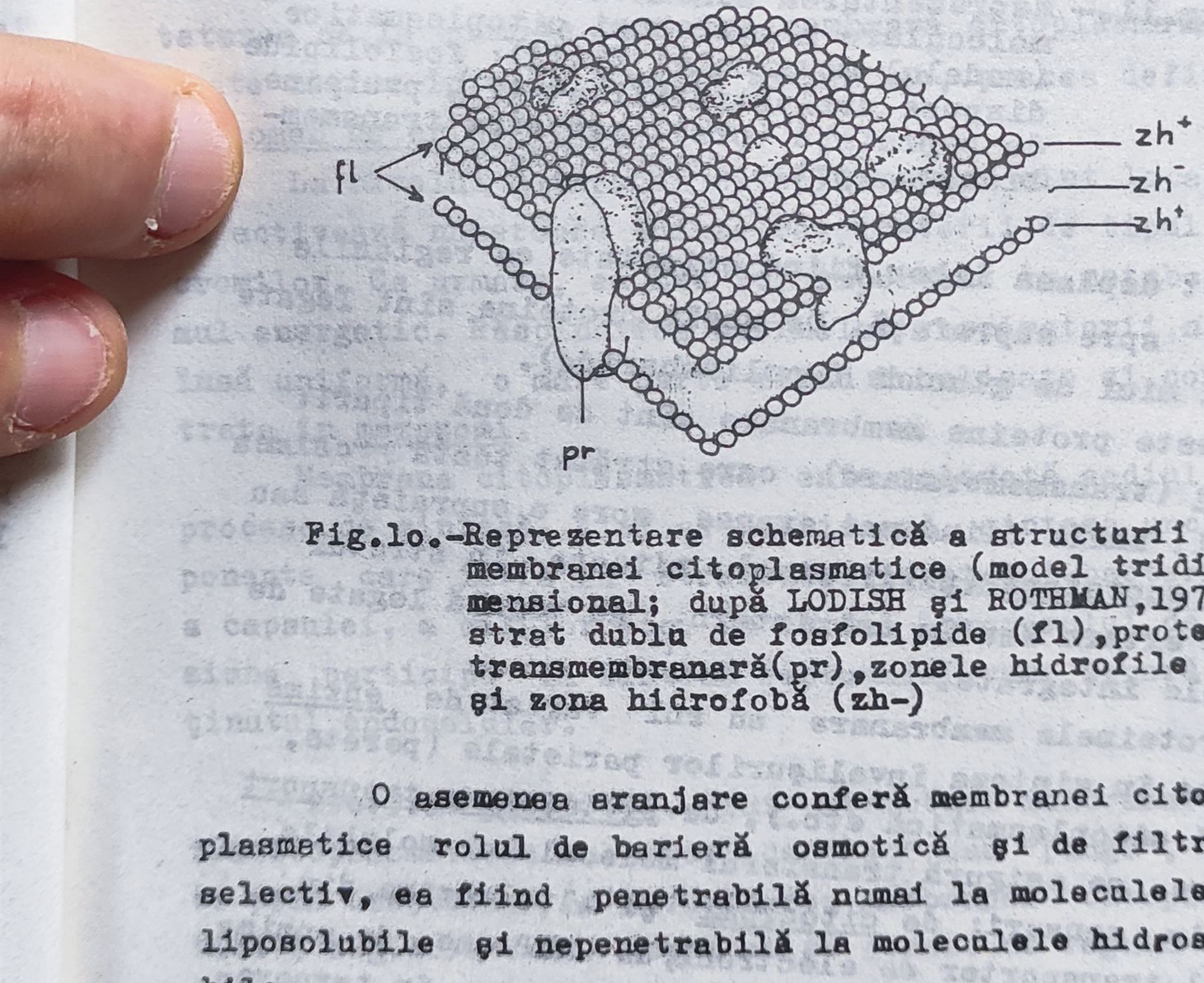


Fig.1o.-Reprezentare schematică a structurii membranei citoplasmatice (model tridimensional; după LODISH şi ROTHMAN,1979); strat dublu de fosfolipide (fl),proteină transmembranară(pr),zonele hidrofile (zh+) şi zona hidrofobă (zh-)

O asemenea aranjare conferă membranei citoplasmatice rolul de barieră osmotică şi de filtru selectiv, ea fiind penetrabilă numai la moleculele liposolubile şi nepenetrabilă la moleculele hidrosolubile.

Moleculele proteice globulare sînt inclavate şi plutesc în stratul fluid dublu lipidic (fig.11).

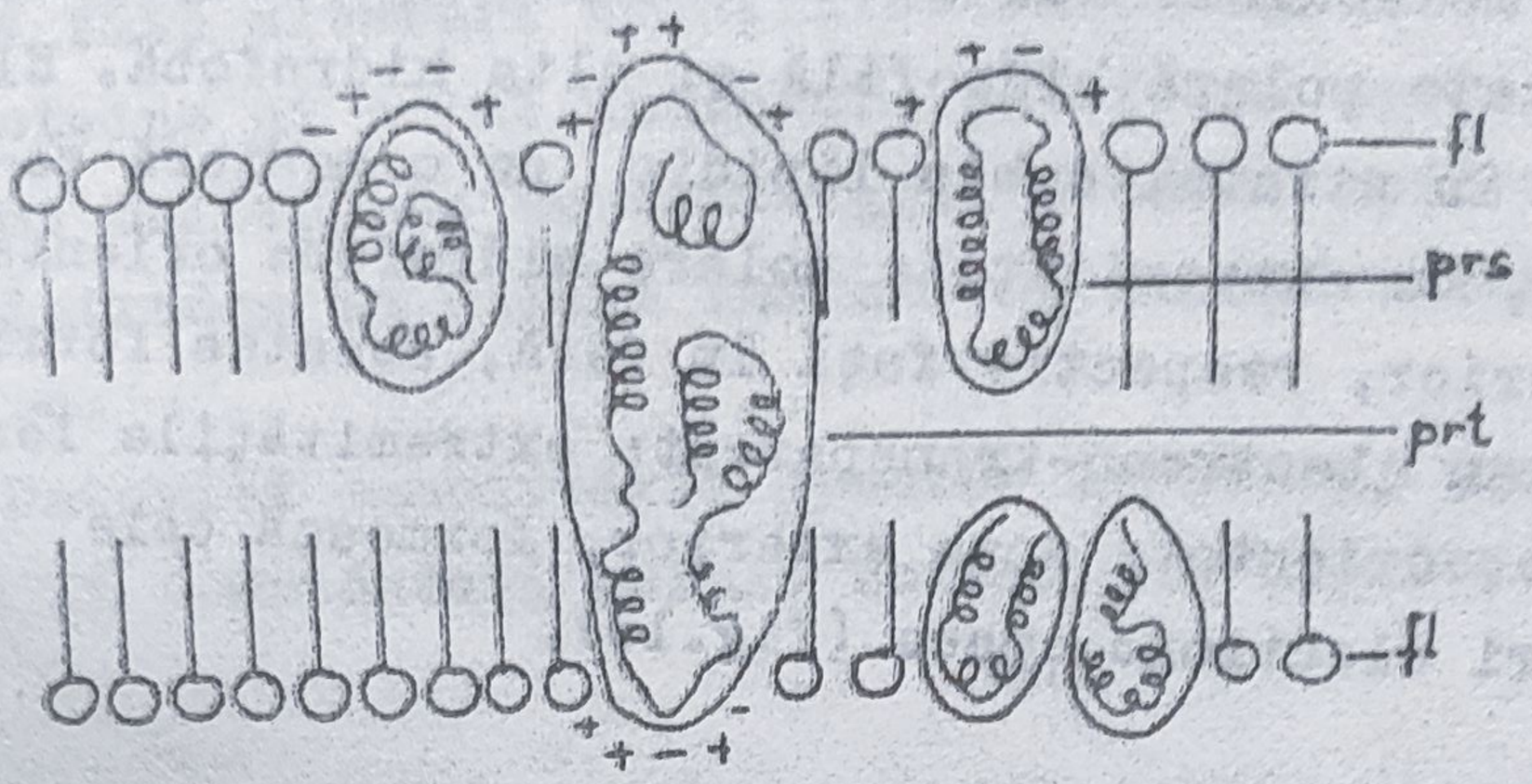


Fig.11.- Reprezentarea schematică a structurii moleculare a membranei citoplasmatice (modelul mozaicului fluid): fosfolipide dispuse dublustratificat (fl), proteine de suprafaţă (prs), proteine transmembranare (prt).

Ele se pot deplasa liber, fiind orientate cu regiunile hidrofile spre suprafaţă. De unele proteine sînt legate cantităţi mici de glucide (polizaharide).

Aceste proteine membranare sînt de două tipuri: <u>integrate</u> (transmembranare) care străbat toată grosimea membranei, unele fiind mai expuse spre o suprafaţă sau alta; <u>de suprafaţă</u> (periferice), situate în stratul lipidic extern sau în cel intern, de regulă legate de proteinele integrate.

Proteinele membranare au rol variat: de <u>enzime</u> implicate în sinteza învelişurilor parietale (perete, membrană citoplasmatică etc.), de <u>proteine de transport</u> prin care se asigură transferul moleculelor solubile în ambele sensuri; de <u>citocromi</u> şi alte enzime din sistemul transportor de electroni, de ATP-aze, de enzime (fosfolipaze, proteaze, peptidaze) implicate în turnoverul lipidelor şi proteinelor membranare etc.

2.6.3.2. Rol biologic. Membrana citoplasmatică îndeplineşte numeroase funcţii. Structura morfo-chimică îi conferă proprietăţi de permeabilitate selectivă, ea îndeplinind rolul de barieră osmotică. La nivelul ei activează numeroase enzime de tipul "permeazelor", cu rol în fixarea şi transportul metaboliţilor în ambele sensuri.

Rolul de "barieră" cu permeabilitate selectivă este atestat şi de faptul că, membrana citoplasmatică permite ieşirea din celulă a unor componente proteice, cum sînt exotoxinele şi exoenzimele, intervenind totodată în reglarea acestor procese.Faptul este confirmat de constatarea că,la anumite variante,membrana citoplasmatică poate reţine în celulă unele exoenzime, proces definit ca "fenomen de cripticitate".

La nivelul membranei citoplasmatice sînt localizate şi activează numeroase enzime respiratorii de tipul citocromilor. Ca urmare, ea are rol important în metabolismul energetic. Răspîndirea enzimelor respiratorii nu este însă uniformă, o mare parte fiind localizate şi concentrate în mezozomi.

Membrana citoplasmatică este totodată sediul unor procese de sinteză. Aici se realizează sinteza unor componente care intră în structura peretelui bacterian, a capsulei, a cililor etc. In cursul procesului de diviziune participă la sinteză septumului care separă conţinutul endocelular.

2.6.3.3. MEZOZOMII. Sînt structuri membranare intracitoplasmatice, cu aspect de "sac" sau "pungă", formate prin creşterea şi invaginarea membranei citoplasmatice (fig.12). Unii mezozomi se găsesc de regulă asociaţi fizic şi/s-au topografic cu septumul de diviziune, cu cromozomul celulei şi cu formarea sporului. După localizarea lor se disting trei tipuri de mezozomi:

septali, nucleari şi periferici.

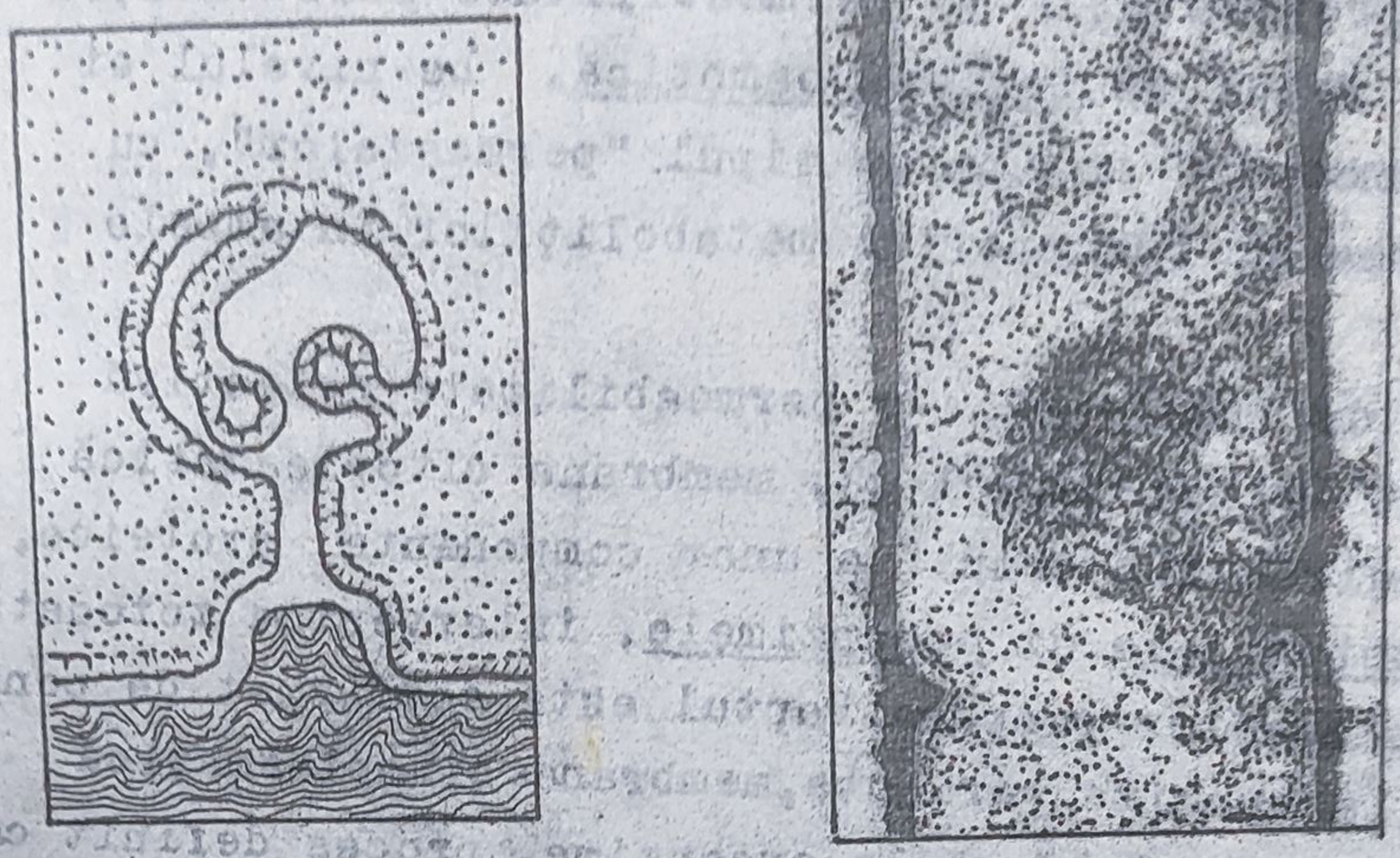


Fig.12.- Mezozom: reprezentare schematică (A) şi după imagine electronooptică (B). Se observă formarea prin invaginarea membranei citoplasmatice.

Sînt mai numeroşi şi mai bine dezvoltaţi la bacteriile Gram-pozitive. La bacteriile Gram-negative sînt rudimentari, slab dezvoltaţi, mai greu de observat şi în număr mai mic.

Aspectul morfologic poate varia, distingîndu-se trei tipuri (fig.13)

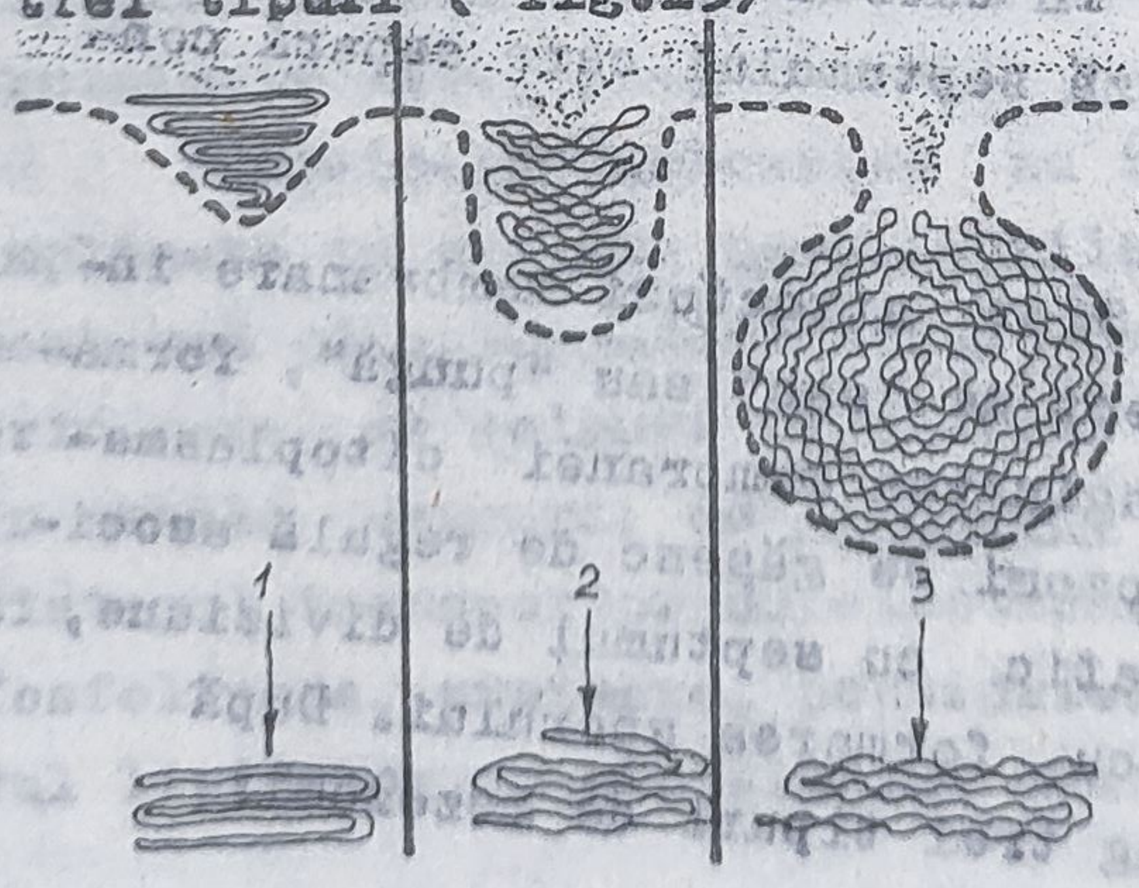


Fig.13.- Tipuri de mezozomi: lamelari (1), tubulari (2) şi veziculari (3).

- <u>mezozomi lamelari</u>, formaţi prin creşterea, invaginarea şi plierea membranei citoplasmatice în spirale răsucite ca un ghem;

- <u>mezozomi tubulari</u>, constituiţi din formaţiuni tubulare, mai mult sau mai puţin lungi şi încolăcite;

- <u>mezozomi veziculari</u> (sacciformi) cu aspect de vezicule aproape sferice.

Formarea mezozomilor este un proces complex. Iau naştere în zone determinate genetic, în care membrana citoplasmatică creşte mai repede decît peretele, ceea ce duce la invaginarea sa, rezultînd iniţial o formaţiune sferoidală, conectată la membrana citoplasmatică printr-un pedunculcu deschiderea spre spaţiul periplasmatic. Intr-o fază mai avansată se produc noi invaginări, plieri şi turtiri care duc la formarea în interior a unor structuri lamelare, veziculare sau tubulare (fig. 14).

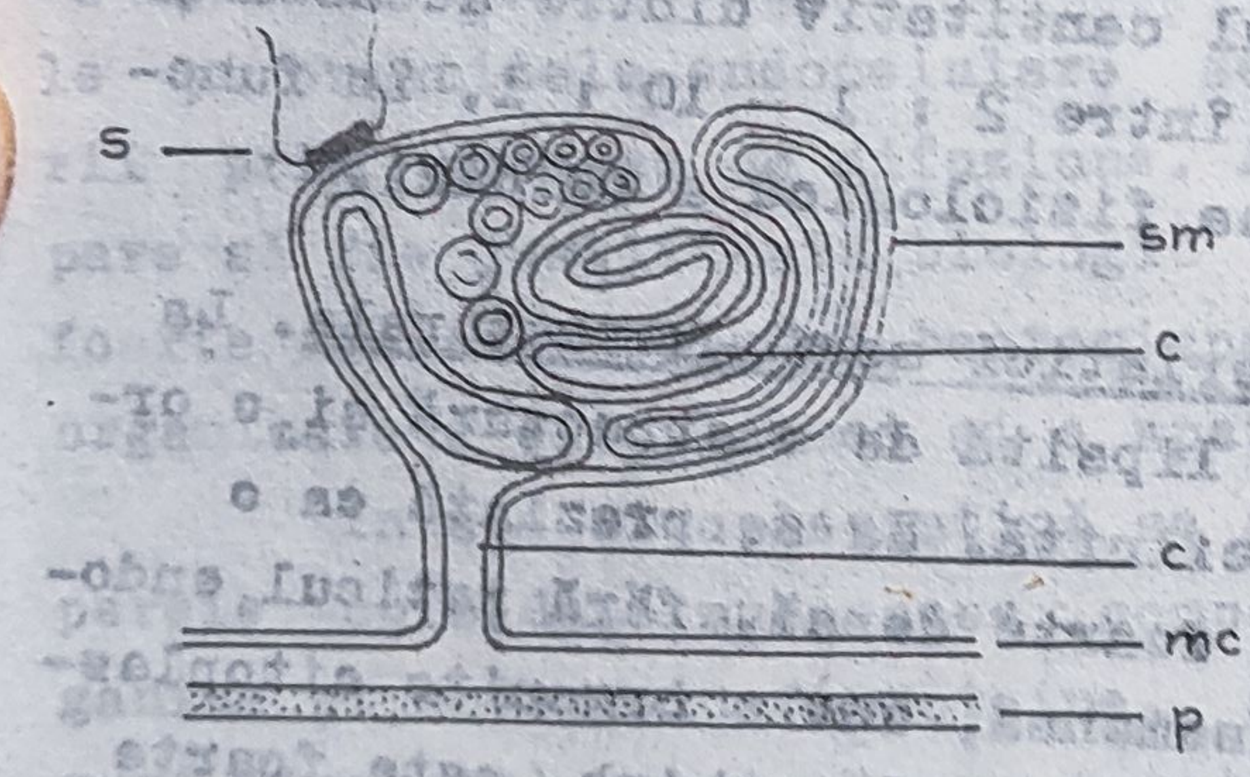


Fig.14.- Reprezentarea schematică a structurii mezozomului şi modul de pătrundere a citoplasmei în structura sa: perete celular (p), membrană citoplasmatică (mc), citoplasmă (c) sac mezozomal (sm), situs de legare a cromozomului situat pe faţa citoplasmatică a mezozomului (s).

Mezozomii sînt organite neesenţiale pentru viabilitatea celulei. Au însă o mare plasticitate, fiind permanent influenţaţi de dinamica proceselor celulare.

<u>Semnificaţia biologică</u> este complexă, mezozomii îndeplinind atribute multifuncţionale. Prin mijlocirea lor se măreşte considerabil suprafaţa membranei citoplasmatice, ceea ce influ-

enţează favorabil activitatea celulară, ca răspuns la condiţiile oferite de mediu.

Au rol în replicarea şi segregarea cromozomului şi în transmiterea de la suprafaţa celulei a semnalului biochimic care iniţiază replicarea.

Sînt organite echivalente mitocondriilor, la nivelul mezozomilor fiind concentrate cantităţi mari de enzime respiratorii, implicate în procese de fosforilare, de oxido-reducere şi de transport de electroni.

Au rol în producerea şi eliberarea unor enzime (penicilinaza), în sinteza membranei celulare şi a septumului de diviziune a peretelui celular etc. Se admite că pot acţiona ca regiune specializată pentru pătrunderea în celulă a unor fragmente străine de ADN transformant, favorizînd astfel procesele de variabilitate.

2.6.4. CITOPLASMA SI ORGANITELE CITOPLASMATICE,

Citoplasma reprezintă cantitativ componentul major al celulei bacteriene. Raportul cantitativ dintre aceasta şi materia nucleară variază între 2 : 1 - 10 : 1, în funcţie de specie şi de starea fiziologică a celulei.

2.6.4.1. Caracteristici morfo-structurale. La bacterii citoplasma este lipsită de o structură şi o organizare internă bine definită. Ea se prezintă ca o masă relativ omogenă şi foarte densă, fără reticul endoplasmatic. Lipsesc, de asemenea, unele organite citoplasmatice, cum sînt mitocondriile. In schimb, este foarte bogată în ribozomi.

Secţiunile ultrafine prin celula bacteriană, examinate la microscopul electronic, au relevat că citoplasma are obişnuit o structură pronunţat granulară, aspect conferit în special de formaţiunile mezozomale răspîndite neuniform în masa sa. Uneori, în funcţie de starea fiziologică a celulelor, citoplasma

bacteriilor poate avea un aspect fibrilar sau chiar reticular. De altfel, omogenitatea şi densitatea materiei citoplasmatice variază în funcţie de starea fiziologică şi de vîrsta bacteriilor, precum şi de condiţiile de cultivare ale acestora. In general, bacteriile din culturile vechi au o citoplasmă mai vîscoasă şi mai puţin omogenă, cu zone de densitate variabilă, cu un aspect granular mai pronunţat, iar uneori chiar cu prezenţa în citoplasmă a unor vacuole şi granule. Din contră, celulele din culturile tinere, în plină activitate metabolică, au o citoplasmă mai fluidă, cu o pronunţată omogenitate şi o puternică bazofilie (datorită mai ales bogăţiei în ARN citoplasmatic).

In citoplasma unor bacterii pot exista vacuole de apă şi granule sau corpusculi metacromatici.

2.6.4.2. Caracteristici fizico-chimice. Materia citoplasmatică are un pronunţat caracter hidric, dar cu toate acestea este lipsită de curenţi perceptibili. Ca urmare, schimburile de metaboliţi între structurile şi organitele endocelulare se realizează la bacterii prin procese de difuziune. Absenţa curenţilor pare să fie justificată biologic atît de dimensiunile foarte mici ale celulei bacteriene, cît şi de modul de organizare a citoplasmei şi a aparatului nuclear.

In apa citoplasmatică se găsesc în stare de dispersie coloidală numeroase componente moleculare organice şi anorganice (proteine, glucide, lipide şi săruri minerale), citoplasma constituind în ansamblul ei un sistem coloidal complex. Acesta se menţine permanent în stare de gel deşi este supus la transformări continui, determinate de activitatea metabolică deosebit de intensă şi de schimburile metabolice foarte active dintre celulă şi mediu. Cu toate acestea, mediul citoplasmatic se menţine într-un echilibru dinamic perfect, pe de o parte prin multitudinea forţelor

fizico-chimice care acţionează la nivel atomic, molecular şi intermolecular, iar pe de altă parte, prin intervenţia unor mecanisme de autoreglare, totalitatea acestora realizînd, în esenţă, menţinerea nealterată a constantelor fizico-chimice endocelulare.

Spre deosebire de celulele altor vieţuitoare, citoplasma bacteriilor este foarte bogată în special în proteine (din care foarte multe enzime) şi în ribonucleoproteine, acestea conferindu-i caracteristicile de densitate şi cvasiomogenitate,precum şi reacţia pronunţată acidă care variază între limite de pH = 2-3.

2.6.4.3. RIBOZOMII. Sînt organite intracitoplasmatice de formă aproximativ sferică, cu diametrul de cca 2o mm şi o constantă de sedimentare 7o S. Au rol esenţial în metabolismul proteic, la nivelul lor realizîndu-se sinteza proteinelor bacteriene.

Din punct de vedere chimic sînt complexe macromoleculare ribonucleoproteinice, formate din 55 molecule proteine şi 3 molecule de ARN. Raportul ARN/proteine variază între 2 : 1 (la E.coli) - 2 : 3 (la alte bacterii.

De fapt asemenea ribozomi sînt alcătuiţi din agregarea a două tipuri de microribozomi: unii mai mici, cu o constantă de sedimentare de 30 S, iar alţii mai mari, cu o constantă de sedimentare de 5o S.

Se apreciază că o celulă poate conţine între 1.5oo - loo.ooo de ribozomi, numărul lor mare fiind în corelaţie cu intensitatea deosebită a proceselor de biosinteză a proteinelor în celula bacteriană.

Majoritatea ribozomilor plutesc liber în citoplasmă, dar o parte se găsesc plasaţi la faţa internă a membranei citoplasmatice. O mare parte sînt legaţi în formaţiuni poliribozomale, la nivelul cărora se realizează sinteza polipeptidelor, ceea ce implică traducerea

informaţiei genetice adusă de ARNm şi translaţia acesteia în structura polipeptidei, respectiv în ordinea de succesiune a acizilor aminaţi.

2.6.4.4. GRANULATIILE SI CORPUSCULII METACROMATICI

In anumite condiţii de mediu, în citoplasma unor bacterii se pot depozita cantităţi apreciabile de substanţe de rezervă (glucide, lipide, metafosfaţi), sub formă de polimeri insolubili în mediul hidric endocelular, cu aspect granular sau corpuscular. Polimerizarea se realizează prin legături fosfoergice în care se înmagazinează cantităţi mari de energie. Ca urmare, aceşti polimeri servesc nu numai ca surse de C, P, şi alte elemente, ci totodată şi ca surse de energie, fiecare etapă a depolimerizării eliberînd cantităţi apreciabile de energie calorică.

Depozitarea ca polimeri insolubili are o profundă semnificaţie biologică, întrucît permite acumularea de cantităţi mari de substanţe de rezervă, fără riscul de a perturba echilibrul fizico-chimic endocelular (ionic şi osmotic). Pe de altă parte, procesele de polimerizare -depolimerizare constituiesc totodată mecanisme importante de asigurare şi autoreglare a balanţei energetice celulare.

Granulele glucidice. In citoplasma multor bacterii, în mod deosebit la bacteriile coliforme, glucoza poate fi polimerizată şi depozitată sub forma de granule de amidon sau de glicogen. Acestea apar, de regulă, sub forma unor granulaţii fine, uneori vizibile numai prin microscopie electronică. Identificarea lor se poate face biochimic, prin colorare cu iod, granulele de glicogen colorîndu-se spre brun, cele de amidon în albastru, iar citoplasma bacteriană în galben.

Granulele lipidice. Sînt frecvente la unele bacterii din g.Bacillus (B.megaterium). Ele rezultă din polimerizarea acidului betahidroxibutiric. Au de regulă

dimensiuni mai mari, fiind vizibile la microscopul optic, mai ales la microscopul cu contrast de fază. Pot fi evidenţiate prin colorarea selectivă cu negru de Sudan.

Granulele de metafosfaţi sau de volutină. Sînt formate prin polimerizarea metafosfatului, care împreună cu ARN-ul dau complexe macromoleculare insolubile. Apar de regulă sub forma unor corpusculi sau granule de dimensiuni mari, pînă la o,6 micrometri, vizibile la microscopul optic. Au afinităţi pentru coloranţii bazici albastri (albastru de toluidină, albastru de metilen) manifestînd proprietăţi de metacromazie (corpusculii se colorează în roşu, iar soma bacteriană în albastru).

Asemenea granule au primit şi denumirea de volutină, după specia bacteriană (Spirillum volutans) la care au fost identificate. Granulaţii metacromatice similare au fost descrise şi la bacilul difteric încă de BABES (corpusculii metacromatici BABES -ERNST).

x

x x

Trebuie subliniat că în citplasma unor bacterii se pot forma şi alte granulaţii: granulaţii de sulf (la sulfobacterii), granulaţii de carbonat de calciu, granulaţii de pigmenţi (la bacteriile pigmentogene) etc.

2.6.4.5. VACUOLELE. In citoplasma bacteriilor se pot forma vacuole de apă. Acestea sînt izolate de materia citoplasmatică printr-o semimembrană numită tonoplast (formată prin condensarea de proteine şi lipide). Dimensiunile lor variază între o,3 - o,6 micrometri.

Natura hidrică a vacuolelor a fost confirmată de constatarea că ele dispar cînd celulele sînt puse într-un mediu hipertonic (KNAYSI, 1951).

Depozitarea apei în vacuole (izolate de materia citoplasmatică) are raţiuni biologice. Celulele în

plină activitate metabolică au nevoie de rezerve endocelulare de apă, prin care să-şi poată autoregla prompt echilibrul ionic şi osmotic. Apa din vacuole poate servi apoi la solvarea şi acumularea în vacuolă a unor metaboliţi sau toxice.

2.6.5. NUCLEUL . La bacterii, formaţiunile nucleare nu pot fi puse în evidenţă prin metodele uzuale de examinare şi colorare, intrucît sînt mascate de materia citplasmatică deosebit de densă şi foarte avidă pentru coloranţii bazici. De aceea, timp îndelungat, existenţa şi organizarea aparatului nuclear au fost supuse contraverselor. Incertitudinile au fost înlăturate parţial o dată cu punerea în evidenţă în celula bacteriană a materiei cromatice nucleare (PIEKARSKI, 1937). Ulterior, prin mijloacele moderne de investigaţie - citochimice, enzimologice, electronooptice- şi în ultima perioadă prin cele de citogenetică, s-a reuşit treptat să se clarifice aproape toate aspectele esenţiale privind forma şi organizarea aparatului nuclear la bacterii.

Structura morfo-chimică. In comparaţie cu nucleul celulelor eucariote, nucleul bacterian este mai puţin individualizat şi evoluat, fiind lipsit de membrană nucleară şi de o structură internă propriu zisă. De altfel, mulţi preferă definirea sa prin termenii de: nucleoid, nucleozom, genom, cromozom etc. O asemenea organizare a aparatului nuclear defineşc bacteriile ca vieţuitoare procariote.

Sub aspect morfologic, nucleul bacterian se prezintă ca o masă compactă de materie cromatică, fără o formă bine determinată. De regulă, la cocі masa nucleară are o formă ovalară, iar la bacili o formă alungită. La celulele bacteriene care se găsesc în faza de multiplicare activă formeţiunile nucleare sînt mai polimorfe,

de regulă multilobate, fiind constituite din două sau chiar patru formaţiuni. Acest aspect este consecinţa faptului că multiplicarea nucleului precede diviziunea proriu zisă a celulei. Ca urmare, în mod tranzitoriu, în aceiaşi celulă se pot găsi două sau chiar mai multe formaţiuni nucleare.

Aparent, formaţiunea nucleară pluteşte liberă în citoplasmă. In realitate, ea se găseşte ancorată la un mezozom din zona ecuatorială a celulei, iar prin intermediul acestuia la membrana citoplasmatică. In procesul de diviziune celulară participă succesiv şi coordonat toate aceste formaţiuni, începînd cu aparatul nuclear.

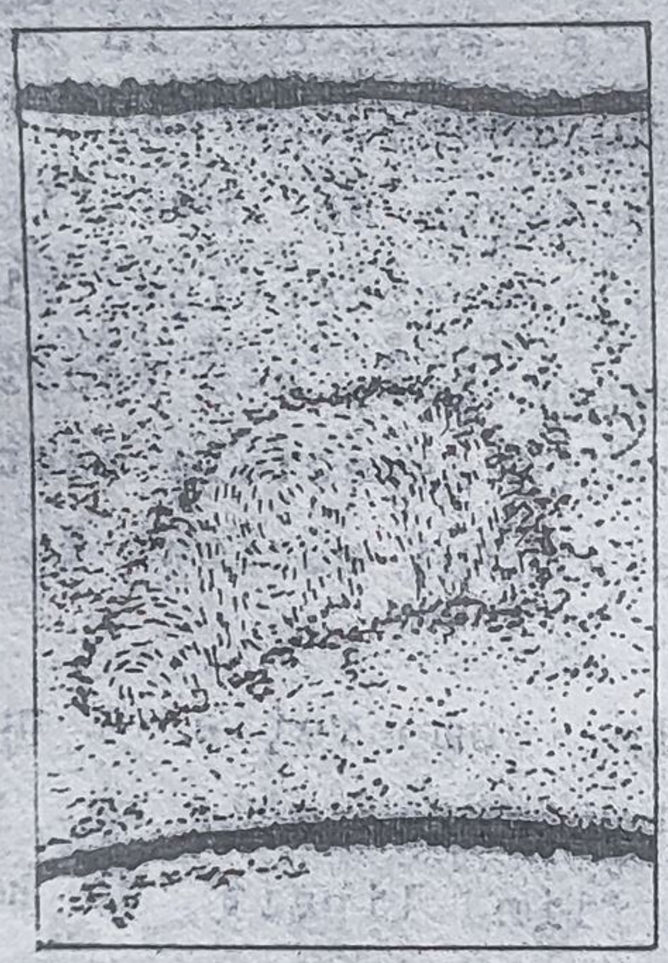


Fig.15.- Nucleul bacterian la B.mycoides, în secţiune ultrafină prin celula bacteriană (după imagine electronooptică x 13o.ooo).

In imaginile electronooptice, formaţiunile nucleare apar constituite dintr-o îngrămădire informă de fibre. Prin derularea şi electronografierea acestora s-a precizat că nucleul bacterian este format de fapt dintr-un singur <u>filament foarte lung de ADN dublu helicoidal</u>, care formează o macromoleculă gigantă. Capetele filamentului sînt legate unul de altul, dînd astfel macromoleculei de ADN o <u>configuraţie circulară</u>, aceasta reprezentînd şi <u>cromozomul unic, circular</u>, al celulei bacteriene. Ca urmare, avînd un singur cromozom, bacteriile sînt definite ca vieţuitoare cu <u>organizare genetică haploidă</u>.

Lungimea filamentului de ADN cromozomul (nuclear) este la E.coli de 1400 micrometri, respectiv de aproximativ 1000 x lungimea celulei. În structura sa se găseşte materializată o cantitate foarte mare de informaţie genetică. Prin plieri, răsuciri şi superrăsuciri, macromolecula de ADN este foarte mult condensată şi adusă la o masă compactă de dimensiuni relativ mici, care ocupă doar 5 - 16 % din volumul celulei. Cantitativ, raportul dintre materia nucleară şi citoplasmă variază între 1:2 - 1:10, în funcţie de specie şi de starea fiziologică a celulei.

Modalităţile prin care se realizează plierea, împachetarea şi menţinerea în stare compactă a filamentului cromozomal sînt încă puţin precizate. La menţinerea compactă contribuie probabil şi alte componente cu care materia nucleară este complexată. De exemplu, la E.coli, nucleul este complexat cu ARN şi proteine (80% ADN, 10 % ARN şi 10 % proteine, majoritatea lor fiind ARN- polimeraze). Prin tratarea complexului cu ribonuclează, molecula dubluhelicală de ADN se eliberează şi se depliază, ceea ce demonstrează că ARN-ul intervine în stabilirea şi menţinerea pliată şi compactă a filamentului de ADN nuclear (cromozomal). Plierea, cu formarea de bucle şi superrăsucirile helicale se produc într-un mod bine determinat, de aşa manieră încît cel puţin un capăt al fiecărei gene să aibă exprimări de suprafaţă, pentru ca acestea să fie accesibile în orice moment la transcrierea informaţiei genetice în moleculele de ARN. La plierea şi aşezarea compactă, în ghirlande, a moleculei de ADN, contribuie însă şi proteinele care complexează nucleul.

Multiplicarea nucleului se face pe cale amitotică, prin replicarea (duplicarea) ADN-ului. Procesul are caracter de multiplicare semiconservativă şi constă în scindarea macromoleculei de ADN în cele două catene,

fiecare catenă servind apoi ca matriţă la sinteza complementară a catenei congenere.In final rezultă două macromolecule identice de ADN, în care se conservă nealterată întreaga informaţie genetică deţinută în cromozom de celula mamă.

2.7. STRUCTURI EXTRAPARIETALE

Unele specii bacteriene pot să-şi sintetizeze, în anumite condiţii de mediu, structuri extraparietale suplimentare, cum sînt: glicocalixul, învelişul mucos şi capsula. Deşi determinate genetic, aceste structuri sînt neesenţiale pentru celulă, întrucît lipsa lor nu-i afectează viabilitatea. Prezenţa lor conferă însă bacteriilor anumite caracteristici şi avantaje biologice. De exemplu, poate asigura protecţia celulei faţă de unii factori nocivi, chimici şi biologici sau pot conferi bacteriilor patogene caracteristici deosebite de agresivitate, acţionînd ca veritabili factori de patogenitate.

Intrucît se întîlnesc numai la unele specii bacteriene, iar la acestea numai în anumite condiţii de mediu şi viaţă, ele pot fi definite şi ca particularităţi morfologice.

2.7.1. GLICOCALIXUL. Unele specii bacteriene se găsesc în mediile naturale încorporate într-o reţea de fibre polizaharidice, asemănătoare cu o pîslă, prin mijlocirea cărora se ataşează la suprafaţa unor substraturi pe care se dezvoltă şi le colonizează. Proprietatea de a sintetiza glicocalix o au şi unele bacterii patogene, în special cele care trăiesc şi se multiplică pe suprafaţa mucoaselor intestinale, a căilor urinare, în cavitatea bucală pe suprafeţele dentare şi în carii etc. Stroma glicocalixului le permite să adere şi să colo-

nizeze aceste suprafeţe, ceea ce contribuie la menţinerea surselor de infecţie în organism. favorizînd totodată agresiunea germenilor. Prin urmare, în cazul acestor bacterii, glicocalixul acţionează ca un veritabil <u>factor de patogenitate</u>.

Pe de altă parte, bacteriile incorporate în glicocalix sînt protejate faţă de bacteriofagi şi de microorganismele bacteriovore (prădătoare).

2.7.2. <u>INVELISUL MUCOS</u>. Multe bacterii sintetizează substanţe insolubile sau puţin solubile în mediile hidrice, care se depun la suprafaţa peretelui celular sub forma unei mase neorganizate de materie mucoasă. Se formează astfel un înveliş mucos care este, la cele mai multe specii, subţire fin, discret şi dificil de pus în evidenţă. Din contră, la unele specii aceste substanţe mucoase sînt secretate în cantităţi excesive, formînd în jurul celulei un înveliş mucos amorf şi gros. O parte a substanţelor mucoase difuzează în mediu, dînd culturilor bacteriene aspecte caracteristice. De exemplu, la Klebsiella pneumoniae, Actinobacillus equuli etc., culturile în medii lichide au o consistenţă vîscoasă, iar coloniile dezvoltate pe suprafaţa gelozei au un pronunţat caracter mucogen, adeseori diffuent (se preling pe suprafaţa mediului ca o picătură de miere de albine) germenii fiind înglobaţi într-o masă de materie vîscoasă. Asemenea variante mucogene pot fi întîlnite şi la alte specii bacteriene.

2.7.3. <u>CAPSULA.</u> Unele bacterii au proprietatea de a-şi putea forma un înveliş extraparietal bine organizat şi individualizat morfo-chimic, numit <u>capsulă</u>.

Dintre speciile patogene, această proprietate o au: <u>Bacillus anthracis</u>, <u>Streptococcus pneumoniae</u> şi unii <u>streptococi din grupele A şi B</u>, <u>Pasteurella multocida</u>,

Escherichia coli, Clostridium welchii, unele specii din g.Klebsiella etc.

Proprietatea de a capsula este o caracteristică determinată genetic, dar la unele specii se exprimă numai atunci cînd germenii ajung în condiţii de mediu favorabile capsulogenezei. De exemplu, la B.anthracis, Str. pneumoniae etc., capsula este sintetizată numai cînd germenii au pătruns în organism şi vin în contact cu umorile acestuia (sau dacă sînt cultivaţi pe medii cu adaos de sînge sau de alte proteine native). In afara organismului, în natură sau în culturile dezvoltate pe mediile uzuale, germenii sînt obişnuit necapsulaţi.

Proprietatea de a capsula este supusă apoi, ca oricare caracter, unor procese de variabilitate. Se pot obţine, de exemplu, variante mucogene de B.anthracis, capabile să sintetizeze capsula în orice condiţii de mediu sau, din contră, variante acapsulogene care au pierdut definitiv (genetic) proprietatea de a capsula. Asemenea variante au fost obţinute şi la alte specii.

Materia capsulară se sintetizează la nivelul membranei citoplasmatice, formarea capsulei fiind în general un proces care decurge de regulă foarte rapid. Astfel, la unele bacterii patogene (B.anthracis, Streptococcus) capsula se sintetizează în 5 - 1o minute după pătrunderea germenilor în organism. Sînt însă şi cîteva specii bacteriene saprofite la care componentele capsulare sînt sintetizate extracelular. Astfel, la Streptococcus salivarius şi Leuconostoc mesenteroides capsula este formată din levan, respectiv dextran, sinteza acestor componente fiind produsă extracelular pe seama glucidelor prezente în mediu.

2.7.3.1. Structura morfo-chimică. Capsula reprezintă un adevărat înveliş extraparietal, cu o organizare morfo-chimică bine definită şi cu afinităţi tinctoriale

distincte de cele ale peretelui bacterian şi a conţinutului endocelular.

Consistenţa materiei capsulare este obişnuit gelatinoasă, ea fiind uşor deformabilă în special la bacteriile recent încapsulate. Aceasta se datoreşte proporţiei mari de apă. De exemplu, la B.anthracis materia capsulară recent formată conţine pînă la 98 % apă. Prin învechire devine însă mai consistentă şi mai puţin deformabilă şi ca urmare capsula are de regulă, la B.anthracis o formă geometrică perfect dreptunghiulară, întrutotul asemănătoare cu a celulei bacteriene.

Grosimea capsulei variază de la o specie la alta, iar la aceiaşi specie în funcţie de condiţiile de cultivare, de vîrsta celulelor etc. De exemplu, la B.anthracis, Str.pneumoniae, Klebsiella etc., învelişul capsular are o grosime apreciabilă, uneori depăşind chiar grosimea bacililor. Din contră, la P.multocida, E.coli, Cl.welchii etc. învelişul capsular este foarte subţire şi greu de pus în evidenţă, constituind o veritabilă <u>microcapsulă</u>.

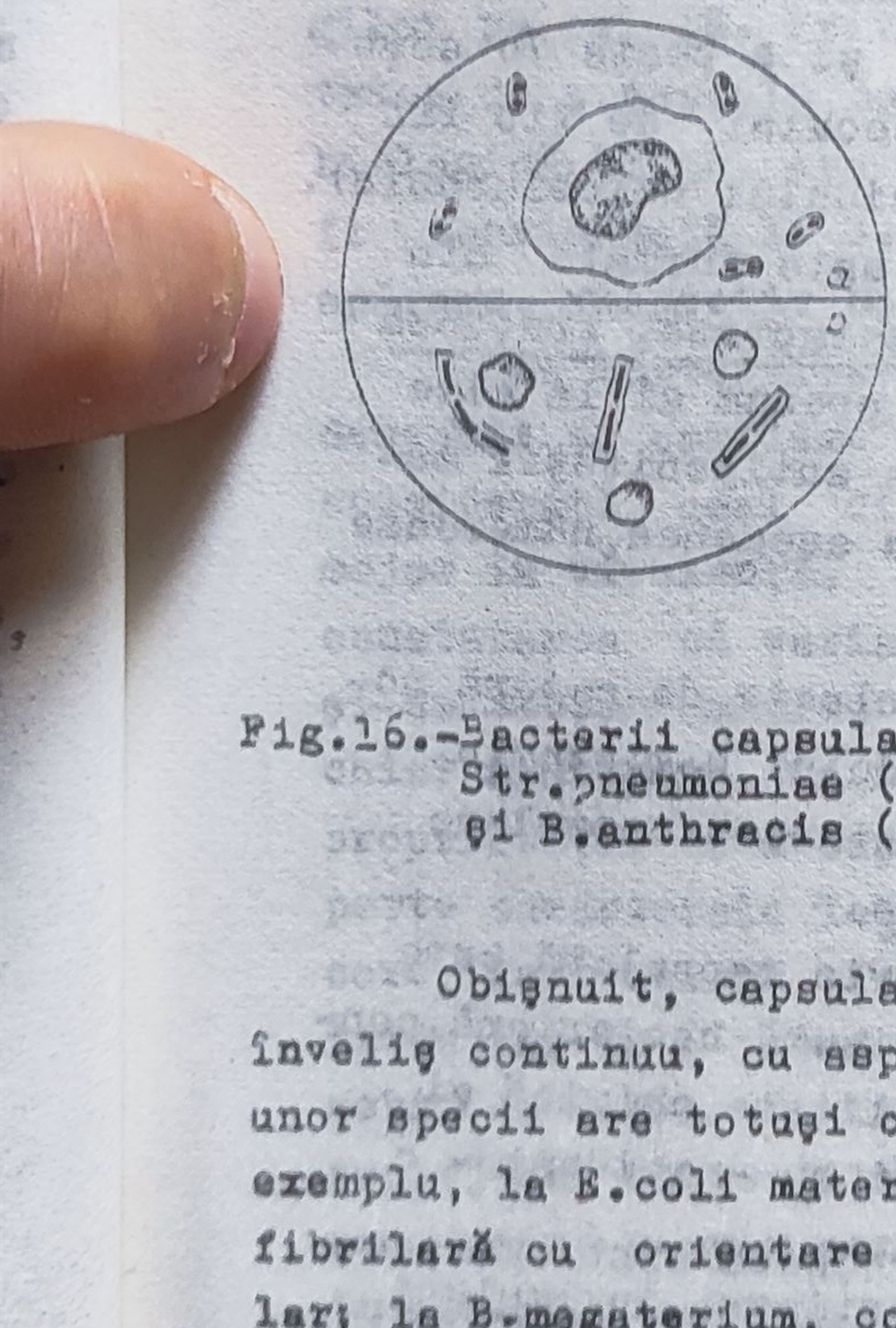


Fig.16.-Bacterii capsulate: Str.pneumoniae (a) şi B.anthracis (b).

Obişnuit, capsula formează în jurul celulei un înveliş continuu, cu aspect aparent omogen. Capsula unor specii are totuşi o infrastructură organizată. De exemplu, la E.coli materia capsulară are o infrastructură fibrilară cu orientare perpendiculară pe peretele celular; la B.megaterium, componentele capsulare polizaharidice formează o infrastructură în reţea, iar componentele

proteice sînt probabil dispuse în ochiurile acesteia.

Componentele care intră în structura capsulei sînt diferite chimic şi antigenic, de la o specie la alta. Astfel, la unele specii capsula conţine numai componente glucidice (polizaharide capsulare) sau numai componente proteice; capsula altor specii este formată din complexe proteice şi glucidice.

La Str.pneumoniae capsula este de natură polizaharidică, în componenţa sa intrînd anumite glucide simple şi aminate, conjugate cu acizi uronici. Asemenea componente sînt însă diferite chimic şi antigenic de la o variantă la alta, ceea ce a permis identificarea în cadrul speciei a peste 3o chemotipuri şi a peste 7o serotipuri (de exemplu, capsula pneumococului de tip III este formată dintr-un polimer al acidului celobiuronic). La alţi streptococi patogeni capsula este formată din acid hialuronic, iar la E.coli din galactoză, fructoză şi acid celobiuronic. La Klebsiella, precum şi la alte specii, pe baza naturii chimice şi a antigenităţii materiei capsulare s-au identificat, de asemenea, numeroase tipuri (variante).

La B.anthracis capsula este exclusiv de natură polipeptidică, fiind un polimer al acidului D-glutamic.

La B.megaterium în structura materiei capsulare intră complexe glucidice şi proteice.

Se poate conchide deci că, materia capsulară este proprie fiecărei specii, tip sau variantă bacteriană, conferind fiecăreia o anumită individualitate chimică şi antigenică[1)]. Asemenea caracteristici au - evident - o

---

1) Majoritatea componentelor capsulare, dacă sînt extrase chimic, se comportă ca haptene sau antigeni incompleţi (polipeptidele capsulare extrase de la B.anthracis, polizaharidele capsulare extrase de la D.pneumoniae). Cînd sînt încorporate însă în capsulă au caracterul de antigeni completi, ceea ce atestă că între componentele capsulare şi unele componente parietale de suprafaţă există legături care le conferă complexitatea structurală necesară exprimării antigenităţii.

mare importanţă în lucrările de diagnostic şi în toxonomia bacteriilor.

2.7.3.2. Rol biologic. Învelişul capsular îndeplineşte - neîndoielnic - un rol protector pentru celula bacteriană. In acest sens, cercetările au relevat că la bacteriile saprofite capsula stînjeneşte înglobarea lor de către protozoare. S-a stabilit de asemenea, că învelişul capsular asigură protecţia celulei faţă de bacteriofagi. De exemplu, la B.anthracis, materia capsulară maschează receptorii de la suprafaţa peretelui bacterian, făcînd astfel imposibilă fixarea bacteriofagilor pe celulă. Privită de pe aceste poziţii, proprietatea de a capsula capătă la bacterii o semnificaţie biologică largă. Aşa cum arată STAMATIN (1966) ea poate fi considerată la B.enthracis ca un factor natural de apărare, respectiv de "imunitate antifagică".

La bacteriile patogene capsula îndeplineşte funcţii deosebit de complexe în procesul de agresiune, fiind considerată unul din factorii de patogenitate, cu rol major în virulenţă. Acest rol este atestat şi de constatarea că variantele acapsulogene de B.anthracis şi de Str.pneumoniae sînt foarte slab patogene sau chiar apatogene. Cu alte cuvinte, odată cu pierderea proprietăţii de a capsula, germenii şi-au pierdut în mare parte caracterele lor de agresivitate. Mecanismele prin care favorizează virulenţa germenilor, respectiv capacitatea lor de a invada tesuturile organismului sînt deosebit de complexe. In primul rînd, învelişul capsular protejează bacteriile pătrunse în organism faţă de acţiunea nocivă a unor enzime şi componente umorale cu rol în apărarea antimicrobiană. De exemplu, maschează antigenii continuţi de peretele celulei, protejînd astfel bacteria faţă de acţiunea anticorpilor care pot exista în umorile organismului.

Cel mai important rol în patogenitatea germenilor este conferit însă de <u>funcţiile antifagocitare</u> exercitate de capsulă. Prezenţa capsulei face dificilă sau chiar imposibilă fagocitoza, întrucît bacteriile capsulate nu mai aderă la membrana fagocitelor şi, ca urmare, nu pot fi înglobate de aceste celule. Pe de altă parte, materia capsulară are, chiar prin natura sa chimică, un rol antifagocitar, exercitînd un efect de "paralizare" a afluxului leucocitar spre focarul de infecţie. Ca urmare, la adăpostul capsulei, germenii patogeni se pot multiplica în umorile şi ţesuturile în care au pătruns, realizînd pînă la urmă invazia organismului.

Se poate concluziona deci că, la bacteriile patogene capsula îndeplineşte funcţii complexe în agresiune, pe de o parte prin protejarea germenilor faţă de fagocite şi faţă de diferiţi factori umorali de apărare antimicrobiană, iar pe de altă parte prin efectele nocive directe pe care materia capsulară le exercită faţă de organismul animal.

2.8. <u>ORGANITE CELULARE</u>

2.8.1. <u>CILII (FLAGELII)</u>. Bacteriile mobile posedă la suprafaţa celulei organite de locomoţie numite <u>cili</u> sau <u>flageli</u>, cu ajutorul cărora pot efectua în mediile hidrice diferite deplasări taxice, cu viteze relativ mari. Acestea sînt organite cilindrice foarte subţiri, lungi şi flexibile, cu numeroase ondulaţii helicoidale regulate.

Originea cililor se găseşte într-o formaţiune numită <u>corpuscul bazal</u> (disc, blefaroblast) situat la faţa internă a membranei citoplasmatice. El traversează peretele bacterian, a cărui rigiditate le ser-

veşte ca punct de sprijin pentru executarea de mişcări rotatorii şi ondulatorii prin care deplasează celula. Acest rol al peretelui este atestat de constatarea că protoplaştii sînt imobili, deşi cilii se pot conserva intacţi la suprafaţa lor.

Existenţa cililor, numărul şi poziţia lor pe suprafaţa bacteriei sînt caracteristici determinate genetic, de mare importanţă în taxonomie şi în lucrările de diagnostic. Ei pot fi puşi în evidenţă prin metode speciale de colorare, dar în lucrările de rutină se recurge numai la evidenţierea indirectă, prin examenul mobilităţii bacteriilor.

In raport cu aceste caracteristici, bacteriile se împart în următoarele tipuri:

- atricha (gr. tricha = păr), lipsite de cili şi deci imobile;
- monotricha, care au un singur cil sau flagel situat la un pol al celulei;
- amphitricha, care posedă doi cili situaţi cîte unul la polii celulei;
- lophotricha, care au mai mulţi cili (5-3o cili) grupaţi într-un smoc situat la un pol al celulei;

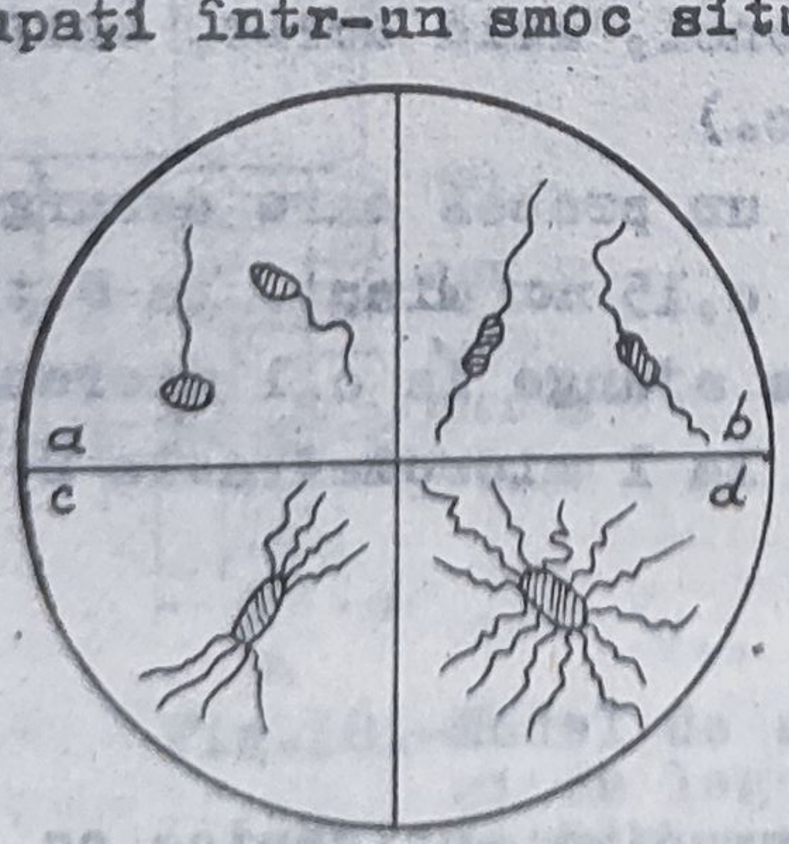


Fig.17.- Tipuri de bacterii ciliate: monotricha (a), amphitricha (b); lophotricha (c) şi peritricha (d).

- peritricha, care au un număr mare de cili (de regulă între 30 - 100 cili) dispuşi într-înprejur, pe toată suprafaţa celulei (de exemplu, la Proteus vulgaris numărul lor ajunge chiar la cîteva sute).

Trebuie subliniat faptul că cilii sînt organite foarte fragile, care se rup uşor. Pierderile lor nu afectează însă viaţa celulei, ceea ce atestă că sînt organite necesenţiale pentru bacterie. De astfel, ca orice caracter, cilii sînt supuşi unor procese de variabilitate fenotipică sau genotipică. Ca urmare, la unele specii s-au putut obţine variante aciliate stabile genetic, cum este, de exemplu, Proteus OX_{19} [1]. La alte specii, sinteza cililor poate fi influenţată temporar de anumiţi factori de mediu (temperatura, diferite substanţe adăugate la mediile de cultivare etc.) Astfel, Yersinia pseudotuberculosis şi Listeria monocitogenes sînt ciliate şi mobile numai cînd germenii sînt cultivaţi la 20-25°C; aceiaşi germeni sînt imobili în culturile incubate la 37° C. De asemenea, Salmonella typhymurium este mobilă în culturile incubate la 37°C şi imobilă în cele incubate la 44°C. Cilii se pot pierde şi prin cultivarea unor specii bacteriene, pe medii la care s-au adăugat anumite substanţe în concentraţii moderate (fenol, acid boric, sulfatiazol, ser hiperimun specific etc.)

Creşterea cililor este un proces care decurge rapid, în medie cu o viteză de 0,15 mc/minut. La S.typhimurium ritmul de creştere poate ajunge la 0,1 micrometri/minut, iar la B.subtilis chiar la 1 micrometru la 2-3 minute.

---

1) Varianta Proteus OX19 are înrudiri antigenice cu Rickettsia prowazekii, fiind utilizată în reacţia Widall pentru diagnosticul tifosului exantematic.

2.8.1.1. STRUCTURA MORFO-CHIMICA. Filamentul ciliar are o formă cilindrică cu ondulaţii regulate helicoidale. Grosimea şi lungimea variază de la o specie la alta, dar şi în funcţie de condiţiile de mediu şi de starea fiziologică a celulei. De regulă, cilii sînt mai lungi la celulele bătrîne şi la bacteriile cultivate pe medii lichide.

Grosimea este uniformă pe toată lungimea lor, diametrul variind între 1o - 3o nm. De exemplu, la Proteus vulgaris şi la Salmonella typhimurium cilii au o grosime în jur de 1o nm, iar la Vibrio-metchnicovii în jur de 3o nm.

Lungimea cililor este în medie de 25 - 3o micrometri, dar la unii spirili saprofiţi poate ajunge pînă la 72 micrometri.

Filamentul ciliar este format predominant din molecule proteice sferoidale denumite flagelină. Aceste molecule au diametrul de 4,6 nm şi o masă moleculară de 4o.ooo daltoni, fiind alcătuite din 11 tipuri de polipeptide. Flagelina este antigenică, reprezentînd antige-

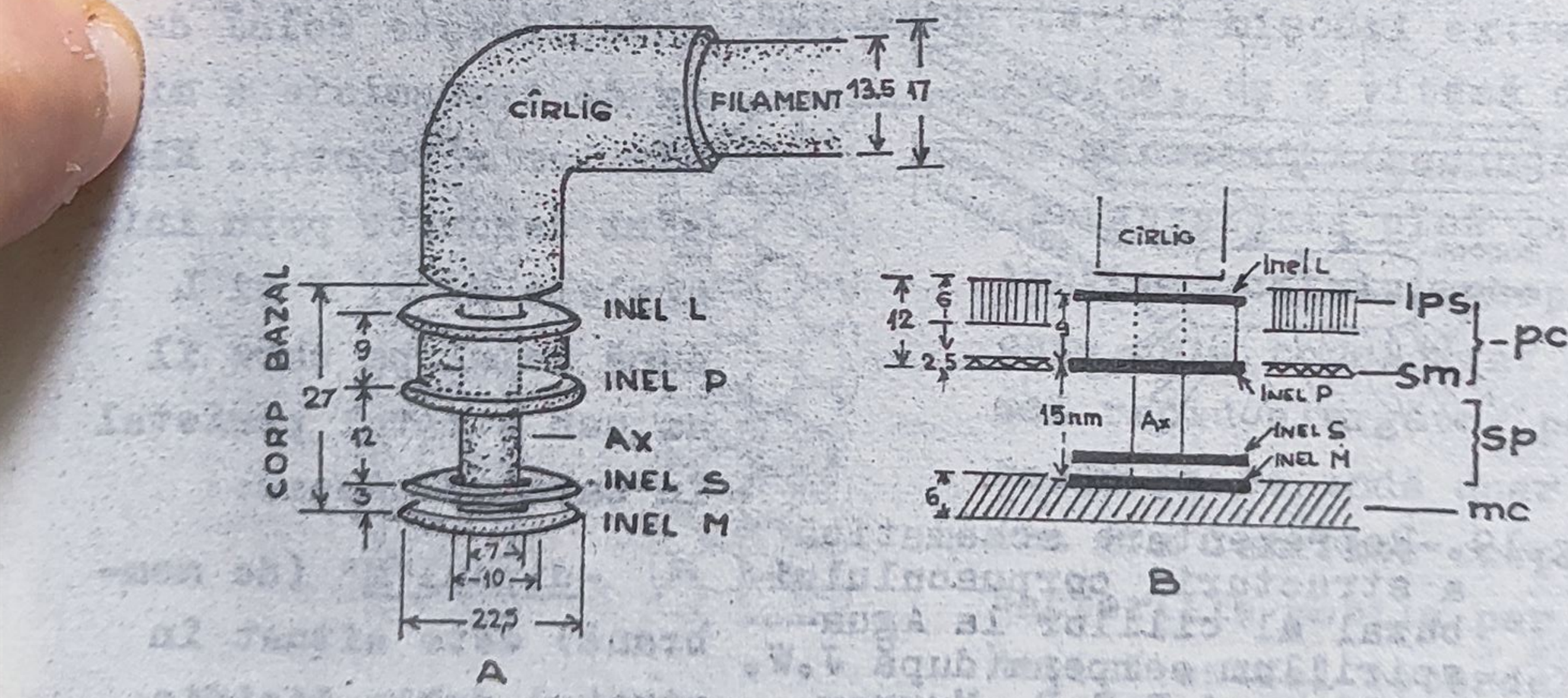


Fig.18.-Model de structură a cililor la E.coli(A) şi de legare a corpusculuı bazal la structurile parietale (B):membrana citoplasmatică (mc) spaţiu periplasmatic (sp) perete celular(pc), stratul mureinic rigid(sm), membrana externă lipopolizaharidică(lps).

nii "H" ai bacteriilor mobile.

Infrastructura cililor este relativ complexă, în alcătuirea lor distrugîndu-se trei componente: corpusculul bazal, cîrligul sau articulaţia şi filamentul ciliar helicoidal.

Corpusculul bazal este formaţiunea în care cilii îşi au originea. Prin alcătuirea sa, acest corpuscul îndeplineşte totodată şi rolul de piesă "rotor", capabilă să imprime cililor mişcări rotatorii într-un sens sau altul. In structura sa se disting 4 discuri la bacteriile Gram-negative şi numai două discuri la bacteriile Gram-pozitive. Prin mijlocirea lor corpusculul bazal se găseşte ancorat în membrana citoplasmatică şi în stratul profund al peretelui bacterian (stratul "R" sau "rigid")(fig.19).

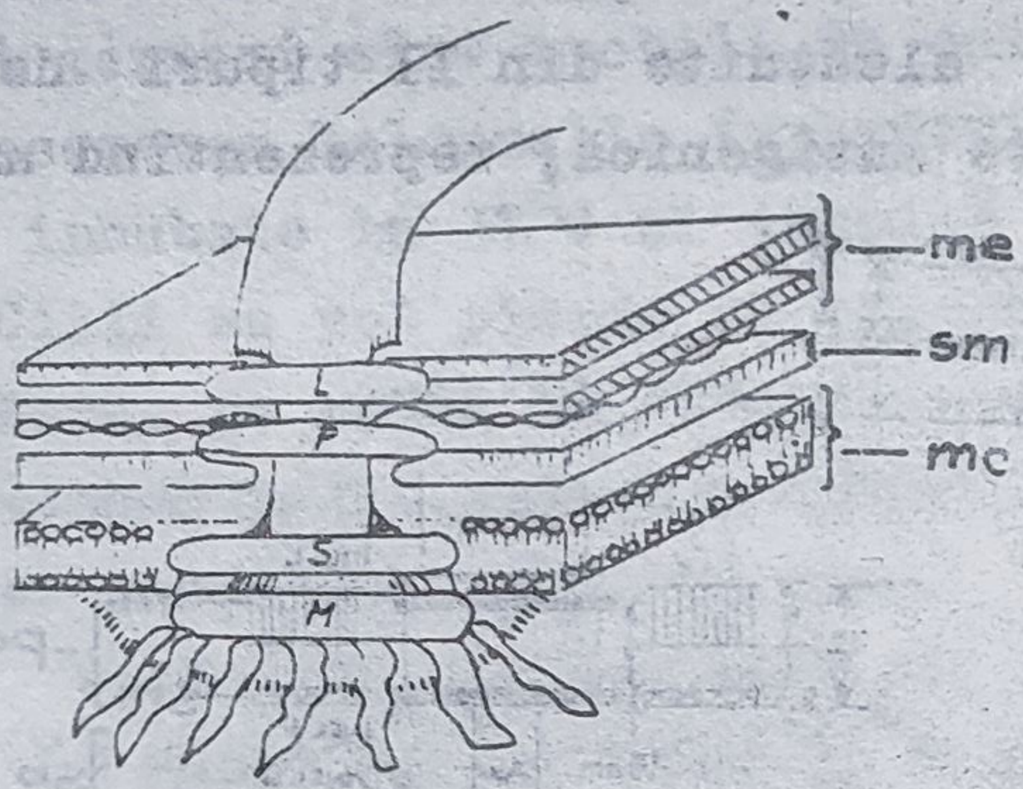


Fig.19.-Reprezentare schematică a structurii corpusculului bazal al cililor la Aguaspirillum serpens(după J.W. Coulton şi R.G.E. Murray 1977):inele L,P, S şi M, membrana externă a peretelui bacterian (m.e),strat mureinic rigid (s.m.),membrana citoplasmatică(m.c.)

Discurile sînt interconectate printr-o piesă intermediară care îndeplineşte rolul de ax de transmisie a mişcărilor rotatorii. Ele sînt denumite prin iniţialele M, S, P şi L după rolul pe care îl au sau stratul parietal în care se găsesc:

-discul "M" (de membrană) este situat în stratul dublu lipidic al membranei citoplasmatice şi îndeplineşte rol de "rotor";

-discul "S" sau "stator" are o poziţie

supramembranară, fiind situat la faţa externă a membranei citoplasmatice;

- <u>discul "P"</u> este intricat în peretele bacterian, în stratul mureinic rigid ("R");

- <u>discul "L"</u> se găseşte în profunzimea membranei externe lps a peretelui.

<u>Cîrligul</u> (sau articulaţia) este o componentă flexibilă, intercalată între corpusculul bazal şi filamentul ciliar.

<u>Filamentul ciliar helicoidal</u> reprezintă cilul propriu zis. Este constituit din molecule sferoidale de flagelină dispuse în aranjament helicoidal (fig.2o).Prin rotirea filamentului se poate imprima celulei mişcări variate, orientate într-un anumit sens sau de rostogolire. Cînd discul "M" se roteşte în sensul acelor de ceasornic se imprimă mişcări de rostogolire, iar cînd se roteşte antiorar se imprimă celulei o deplasare în linie dreaptă. Intr-un minut se pot efectua pînă la cca 4o-5o rotiri. Acestea pot imprima bacteriei mişcări extrem de rapide, cu o viteză de 2o-8o micrometri/secundă,ceea-ce reprezintă pînă la 4o x lungimea celulei(ghepardul care este considerat cel mai rapid alergător,parcurge pe secundă doar de cca 3 x lungimea corporală. Bacteriile mobile par să deţină astfel recordul de viteză între vieţuitoare.)

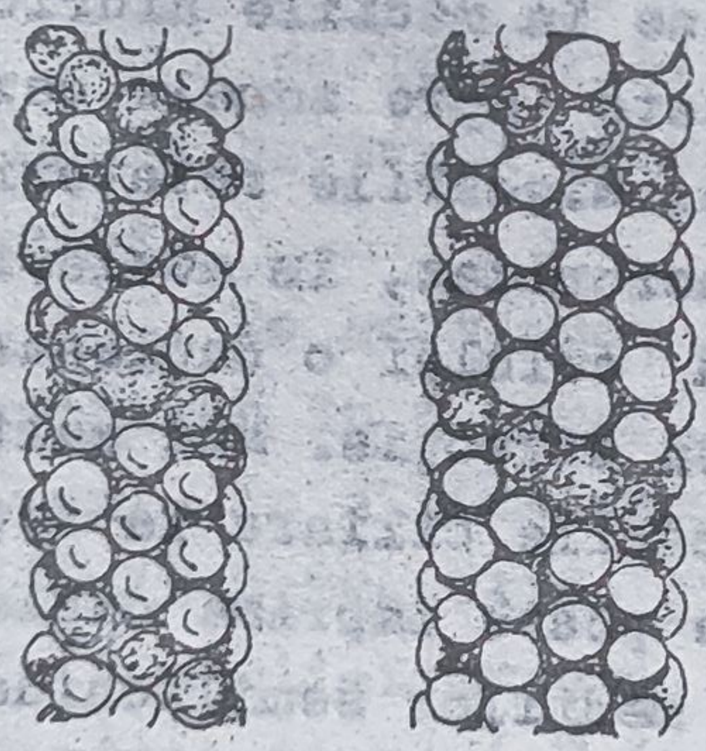


Fig.2o.Modele de aranjare a moleculelor proteice sferoidale în structura ciliar.

Mişcarea de rotire este imprimată de încărcătura electrică de sens contrar, care determină o transloca-

ţie a ionilor de pe discul "M" pe discul "S". Baza biochimică a energiei necesare este mai puţin cunoscută. Unele probe sprijină opinia că energia este generată într-un sistem în care participă ATP-ul (similar proceselor care se petrec în fibra musculară). De exemplu, la bacteriile strict aerobe lipsa oxigenului determină abolirea mişcărilor ciliare, probabil datorită imposibilităţii celulei de a elabora ATP. Sînt însă şi specii aerobe la care mobilitatea se poate păstra şi în condiţii de anaerobioză, datorită probabil unor mecanisme care le permit refacerea anaerobă a ATP-ului. Un rol esenţial în acest sens îl are prezenţa în mediu a argininei, care prin fosforilare serveşte bacteriilor anaerobe ca unic substrat chimic pentru obţinerea ATP-ului. Reacţia s-ar desfăşura la Pseudomonas fluorescens astfel:

$$\text{Arginină} + \text{ADP} + H_3PO_4 + H_2O \longrightarrow \text{Ornitinină} + \text{ATP} + NH_3$$

2.8.1.2. Rol biologic. Mobilitatea imprimată de cili are raţiune şi utilitate biologică, în sensul că permite bacteriilor să efectueze în mediile hidrice numeroase deplasări taxice, orientate spre zonele care le oferă condiţii optime de viaţă. Mişcările rotatorii şi ondulatorii sînt executate sincronizat, în acelaşi sens de toţi cilii, ceea ce imprimă celulei o deplasare orientată în spaţiu într-o anumită direcţie. Mai mult, unele specii îşi pot sincroniza mişcările ciliare la toţi germenii dintr-o colonie, ceea ce poate imprima deplasarea lentă a acesteia pe suprafaţa mediilor semilichide.

Caracterul taxic al mobilităţii este atestat de constatarea că, puse într-un mediu cu concentraţii diferite de oxigen, bacteriile aerobe se deplasează spre zonele în care oxigenul se găseşte în concentraţii maxime, iar bacteriile anaerobe spre zonele cu concentraţii minimă. Acest fenomen este denumit aerotaxie. De exemplu, dacă germenii sînt puşi într-o picătură strivită între

lamă şi lamelă, după o perioadă de timp bacteriile aerobe se aglomerează spre zonele periferice, unde datorită contactului cu aerul se găsesc concentraţii mai mari de oxigen ; din contră, bacteriile anaerobe se aglomerează spre zona centrală a picăturii strivite unde oxigenul se găseşte în concentraţia minimă. Asemenea deplasări taxice pot fi induse şi de alţi factori. De exemplu, bacteriile care posedă anumiţi pigmenţi fotosintetizanţi execută în mediile hidrice deplasări spre zonele cele mai luminoase, fenomen denumit <u>fototaxie</u> etc. In general sînt atractante, respectiv exercită un chimiotactism pozitiv, substanţele utile în metabolism (glucide, acizi aminaţi, ioni de calciu şi de Mg etc.) în timp ce substanţele nocive (acizi graşi, alcooli, ioni ai metalelor grele etc.) au efect repelent(de respingere sau chimiotactic negativ).

2.8.2. <u>PILII (FIMBRIILE)</u>. Sînt organite filamentoase, cilindrice, foarte subţiri, scurte şi drepte, aparent rigide, dispersate des pe toată suprafaţa celulei (ca o perie). Pilii pot fi puşi în evidenţă <u>numai</u> la unele bacterii Gram-negative, prin microscopie electronică.

Pe baza unor caractere morfo-funcţionale se diferenţiază în 6 tipuri: I, II, III, IV, V şi F (pilii de sex). In ultima perioadă se tinde să se utilizeze tot mai mult termenul de <u>fimbrii</u> pentru definirea <u>tipurilor</u> I-V (fimbrii-franjuri), iar a termenului de <u>pili</u> pentru definirea tipului F (<u>pili</u> = păr).

Numărul pililor diferă cu specia şi tipul lor, între 1 - 1000 în cazul tipurilor I -V şi între 1 - 10 în cazul tipului F.

2.8.2.1. <u>Structura morfo-chimică</u>. Pilii de tip I- V sînt organite tubulare subţiri, cu diametrul între

3 - 14 nm şi o lungime între 1 - 2o micrometri, formate din molecule de "fimbrilină" (o proteină cu masa molec. de 16.6oo dal.) dispuse pe un singur rînd, într-un aranjament helicoidal (fig. 21).

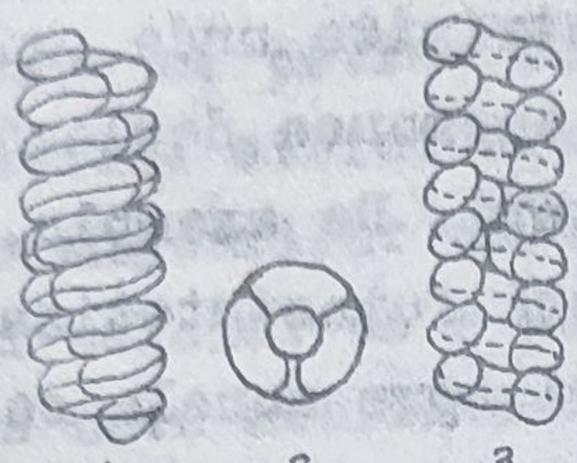


Fig.21.-Reprezentarea schematică a structurii pililor: aspect lateral (1), pe secţiune transversală (2) şi pe secţiune longitudinală(3).

Pilii sexuali F sînt organite tubulare puţin mai groase, cu diametrul de 6 - 15 nm şi o lungime, de regulă, de 2o micrometri. Sînt formaţi din molecule de "pilină", o fosfoglicoproteină cu masa molec. de 11.8oo dal. Subunităţile acesteia se dispun, la fel, pe un singur rînd, într-un aranjament helicoidal, delimitînd un canal axial cu Ø de 25 Å, prin care pot trece moleculele de ADN dublucatenar. Capătul acestor pili are formă de buton, fiind constituit dintr-un disc cu diametrul de 5 - 2e nm şi o formaţiune de 4o - 8o nm cu aspect de cupă sau calici.u.

2.8.2.2. Rol biologic. Rolul şi semnificaţia biologică nu sînt cunoscute încă în totalitate. Prezenţa pililor conferă însă bacteriilor unele avantaje biologice şi un surplus de vitalitate.

Pilii de tip I-V fac posibilă fixarea bacteriilor pe anumite suporturi celulare sau de altă natură pe care le pot astfel şi coloniza. Astfel, bacteriile adaptate la mediile hidrice pot forma agregate prin intermediul pililor, în zonele sau pe substraturile care conţin anumite substanţe nutritive. De exemplu, speciile care trăiesc în profunzimea apelor stagnante se pot aglomera sub forma unor mase mai dense de germeni, iar

altele pot forma pelicule de bacterii la suprafaţă.

Pilii conferă unor enterobacterii patogene abilitatea de a se fixa şi coloniza suprafaţa mucoasei intestinale. De exemplu, serotipurile enteropatogene de E.coli K_{88} şi K_{99} posedă aparat fimbrilar care le dă abilitatea de a se fixa pe celulele epiteliului intestinal la purcei, respectiv la viţei, şi de a coloniza suprafaţa mucoasei intestinale. Ca urmare, pilii conferă acestor serotipuri un plus de agresivitate, acţionînd ca un veritabil <u>factor de patogenitate</u>.

<u>Pilii F</u> (sexuali) sînt <u>organite de copulare</u>, prin mijlocirea cărora se realizează, în cursul proceselor de conjugare, cuplarea celulelor bacteriene F^+ şi F^-. diferenţiate ca polaritate sexuală (celulele F^+ fiind donatoare de material genetic sînt considerate arbitrar "masculi", iar celulele F^- fiind acceptoare de material genetic sînt considerate arbitrar "femele"). Canalul piliar serveşte la transferul de material genetic (ADN) de la celula F^+ la F^-. Pilii F (de sex) se găsesc la suprafaţa celulelor F^+. Sinteza lor este specificată şi controlată de plasmida F (sau de alte plasmide "sexductoare").

Pilii F au şi rolul de "zonă receptoare" pentru unii bacteriologi lipsiţi de apendice caudal (fagii "m" şi "R 17"), genomul acestora fiind introdus în celulă tot prin canalul piliar.

2.9. <u>SPORUL SI SPOROGENEZA</u>

Sporul bacterian este o <u>formaţiune morfo-biologică</u> dotată cu o rezistenţă crescută la agenţii fizico-chimici (uscăciune, căldură, frig, radiaţii, antiseptice şi dezinfectante etc.), prin care bacteria îşi poate conserva viabilitatea timp îndelungat, în stare latentă, în condiţii în care forma vegetativ nu ar putea supravieţui.

Proprietatea de a sporula o au un număr restrîns de specii bacteriene, toate încadrate în familia Bacillaceae: specille aerobe sporulează facultativ şi formează g.Bacillus (B.anthracis, B.subtilis, B.cereus, B.megaterium etc.), iar speciile anaerobe sporulează constant şi formează g.Clostridium (Cl.botulinum, Cl. tetani, Cl.septicum, Cl.chauvoi, Cl.welchii etc.).

Excepţional, preprietatea de a sporula o pot avea şi unii cocci (Sporosarcina ureae).

2.9.1. Sporogeneza. Sporul se formează în celula bacteriană prin procese complexe de reorganizare morfochimică. Se deosebeşte fundamental de forma vegetativă din care provine.

De regulă, dintr-o celulă bacteriană rezultă un singur spor, iar din aceasta - prin germinare - la naştere o singură formă vegetativă. Ca urmare, sporogeneza nu constituie pentru bacterii o modalitate şi un mijloc de multiplicare. Prin natura sa este un fenomen unic pe plan biologic, în cursul căruia forma vegetativă se transformă într-o "unitate biologică" nouă, capabilă să conserve viaţa bacteriei în stare latentă timp îndelungat (luni sau ani).

Mult timp s-a considerat că sporularea este indusă de condiţii nefavorabile de viaţă, care impun transformarea bacteriei într-o formă de rezistenţă. Opinia este însă infirmată de numeroase date, în special de constatarea că sporularea se manifestă cu intensitate maximă mai ales cînd germenii se găsesc în condiţii optime de mediu şi viaţă. De aceea, în accepţiunea actuală, sporogeneza este considerată ca un fenomen normal în evoluţia celulei bacteriene, procesul fiind controlat şi dirijat morfogenetic de cca 5o de gene.

Datele experimentale privind dinamica sporogenezei într-o populaţie bacteriană duc spre concluzia că, celula devine probabil competentă să sporuleze numai cînd

atinge în evoluţia sa un anumit stadiu, o anumită "maturare" biologică. Cu alte cuvinte, fenomenul poate fi considerat ca o etapă " terminus" în evoluţia formei vegetative. De altfel, "necesitatea" biologică a sporulării pare să fie sugerată şi de faptul că, după germinarea sporilor, formele vegetative noi par întinerite, fiind foarte active metabolic şi avînd un ritm de diviziune deosebit de intens. Pe de altă parte, numai aşa se poate explica de ce într-o populaţie de B.subtilis, aflată în faza de multiplicare exponenţială, proporţia bacteriilor sporulente se menţine aproximativ constantă pe toată durata fazei, la cca 5 %, în timp ce în faza staţionară sporularea se produce în masă. O explicaţie ar putea fi faptul că, în faza de multiplicare exponenţială germenii sporulează succesiv, pe măsură ce formele vegetative ating în evoluţia lor stadiul de maturare biologică care le permite sporularea. Sporii la scurt timp după formare germinează şi ciclul se reia. Din contră, în faza staţionară sporii nu mai găsesc condiţii optimale pentru germinare şi se menţin ca atare, proporţia lor crescînd aproape exploziv.

Asemenea aspecte sugerează că sporularea şi germinarea sporilor nu sînt fenomene întîmplătoare, ci procese supuse permanent unor mecanisme de autocontrol şi reglare genetică, dar care pot fi induse de numeroşi factori endogeni şi exogeni.

Rolul factorilor endogeni în sporogeneză este atestat de constatarea că, în condiţii de mediu identice nu toate tipurile aceleiaşi specii sporulează la fel de intens. Rapiditatea de sporulare variază, de altfel, chiar de la o celulă la alta. Pe de altă parte proprietatea de a sporula poate fi pierdută, putîndu-se obţine variante asporogene stabile genetic.

Proprietatea de a sporula este supusă apoi unor procese multiple de variabilitate fenotipică,

sporogeneza fiind stimulată sau inhibată de numeroşi factori exogeni. De exemplu, oxigenul molecular este un factor indispensabil sporulării bacteriilor aerobe; pentru bacteriile anaerobe este însă nociv, sporularea lor putînd fi inhibată complet de prezenţa acestuia în mediu. De exemplu, B. anthracis nu sporulează în organismul animal, dar sporulează intens în materialele patologice (sînge, secreţii, piei) îndată ce acestea vin în contact cu aerul. De asemenea, în culturile dezvoltate pe suprafaţa mediilor solide, cît şi în cele dezvoltate în mediile lichide puternic aerate, bacili sporulează mult mai rapid şi mai intens.

Temperatura influenţează de asemenea sporularea. De exemplu, B. anthracis sporulează la temperaturi cuprinse între 16° - 42°; în afara acestor limite sporularea încetează, deşi multiplicarea germenilor mai poate continua.

Sporogeneza este influenţată apoi de numeroşi alţi factori de mediu: pH, diferite substanţe chimice etc. Este stimulată de fosfaţi, săruri de amoniu, acid ascorbic, cazeină etc., dar este inhibată total sau parţial de ionii de calciu, de glicerină etc.

Morfogeneza sporului a fost amplu studiată prin microscopia electronică. In faza premergătoare sporulării se produce replicarea şi reorganizarea aparatului nuclear, o formaţiune nucleară fiind antrenată, prin mezozomul de care se leagă, spre zona de formare a sporului (fig.22). In jurul acesteia,

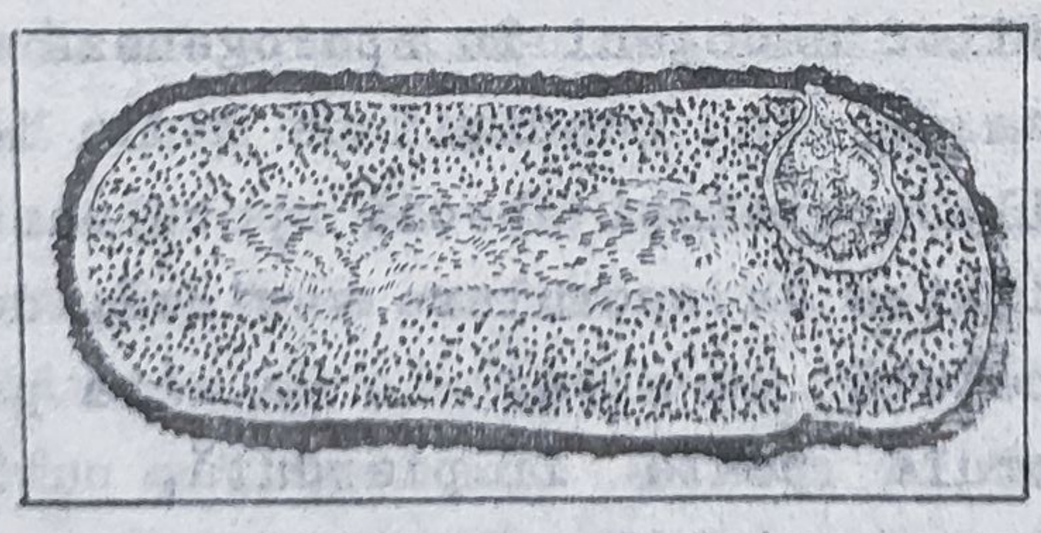


Fig.22.-Stadiu incipient de sporulare(după imagine electronooptică x 7o.ooo; RYTER, 1965).

materia citoplasmatică se restructurează şi se densifică, devenind tot mai refringentă (mai opacă la lumină şi electroni) formînd astfel sporoplasma. Componentele sporale sînt apoi separate de conţinutul endocelular printr-o membrană sporală proprie (derivată iniţial din membrana citoplasmatică) (fig. 23). In fazele ulterioare se formează un perete sporal pluristratificat, compact, gros şi foarte rezistent. O dată cu morfogeneza acestuia se produce şi o organizare a constituienţilor sporali, atingîndu-se astfel stadiul de maturare a sporului. In final rezultă un spor bine individualizat morfo-chimic.

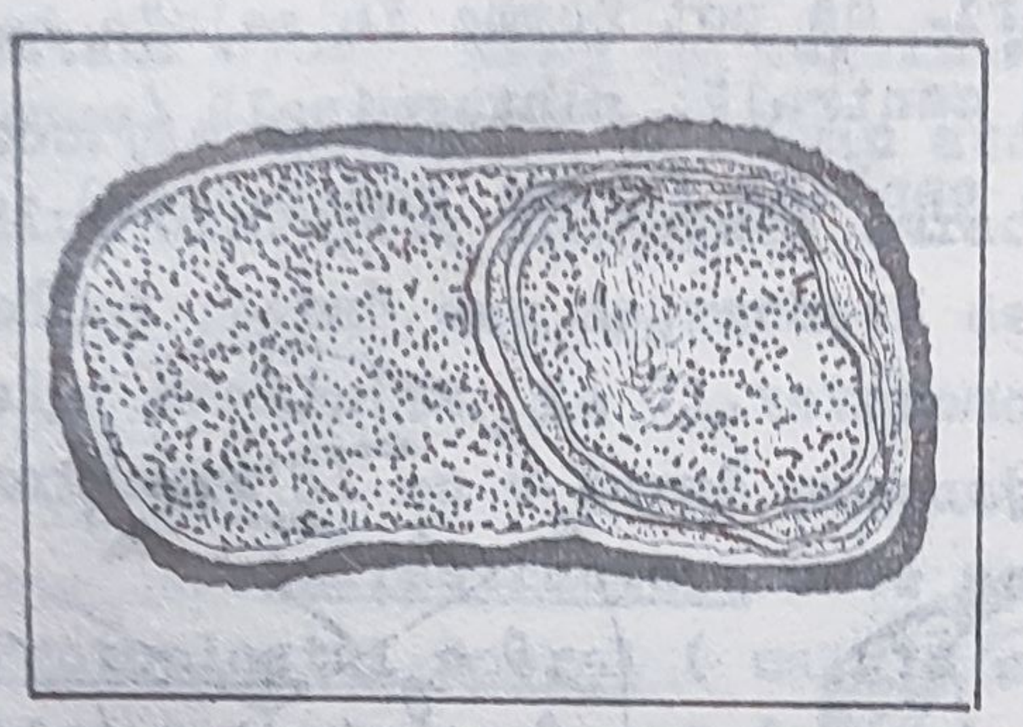


Fig.23. Stadiu presporal avansat. Se observă formarea membranelor sporale(după imagine electronooptică x 7o.ooo; RYTER, 1965).

De regulă după sporulare peretele bacterian este dezintegrat, la unele specii rapid, la altele mai lent, prin enzimele autolitice conţinute de celulă, sporul fiind astfel eliberat în mediul ambiant. Uneori, în

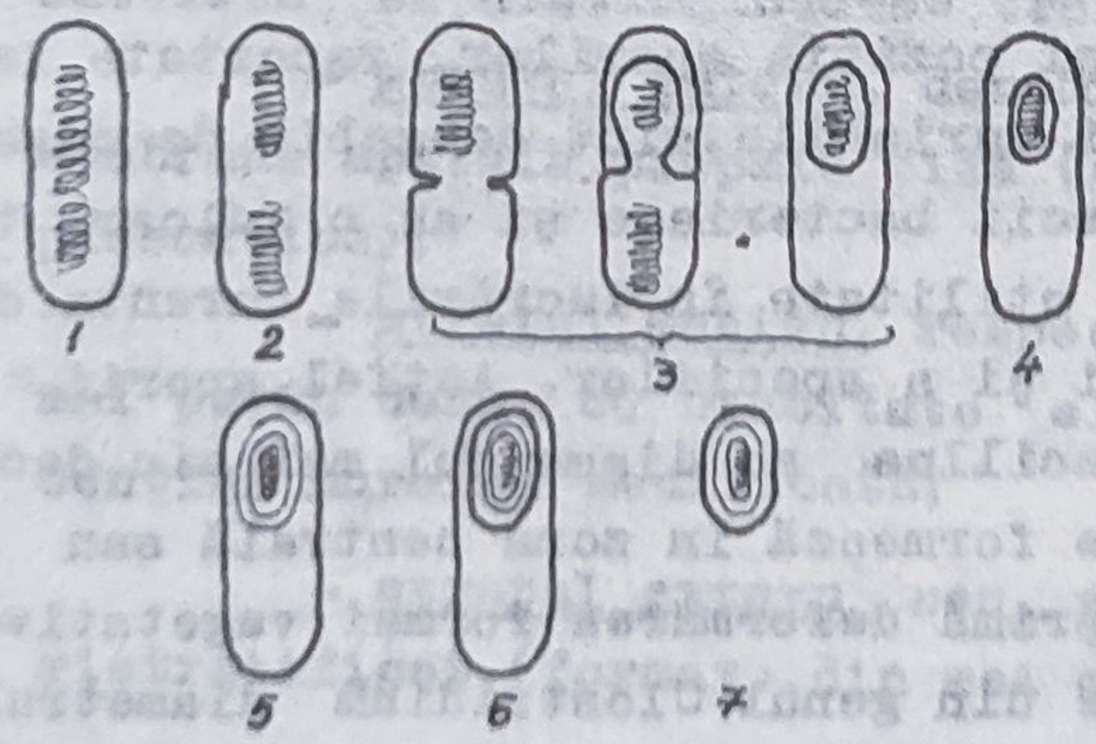


Figura 24.
Faze în sporogeneză: Stadiu premergător sporulării(1), separarea cromozomilor rezultaţi prin replicare(2),stadii de formare a sporului (3), formarea cortexului (4) şi a tunicilor(5),Spor matur(6) şi spor liber(7).

jurul sporului se pot păstra resturi din peretele bacterian care formează un învelig exterior denumit exosporium.

2.9.2. Structura morfo-chimică. Sporii au o formă sferoidală, ușor ovalară, dimensiunile variind cu specia între 0,5 - 2 micrometri. Se pot forma în celula bacteriană (fig.25) în zona centrală, subterminală (spre un capăt)și terminală (la capătul formei vegetative) (fig.26)

Fig.25.-Spor constituit în interiorul formei vegetative (STANIER,1966)

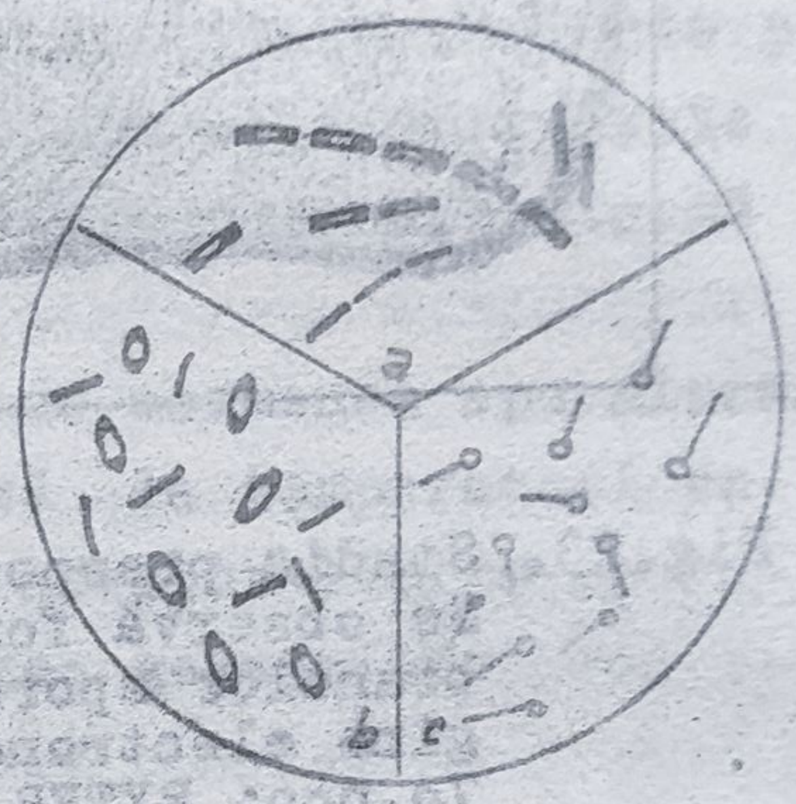


Fig.26.-Tipuri de bacterii sporulate:a-spori centrali(B. anthracis); b-spori centrali și subterminali(Cl.botulinum);c-spori terminali(Cl.tetani).

Dimensiunile și poziția sporilor, raportate la forma vegetativă, deși variabile,sînt deosebit de caracteristice la unele specii bacteriene și au o valoare taxonomică, fiind de mare utilitate în lucrările curente de identificare a genului și a speciilor. Astfel,sporii speciilor din genul Bacillus au diametrul mai mic decît grosimea bacililor, se formează în zona centrală sau subterminală și nu imprimă deformarea formei vegetative. Din contră,la speciile din genul Clostridium diametrul sporilor depășește de regulă grosimea formei vegetative, imprimînd deformarea acesteia; cînd sporii ocupă o

poziţie centrală, bacteriile sporulate iau o formă navi-
culară, asemănătoare cu o suveică (bombate în zona cen-
trală), iar cînd sporii au o poziţie subterminală, baci-
lii iau formă bombată spre unul din capete, asemănătoare
cu a unei sticle de lampă sau cu o pară. La Clostridium
tetani sporii sînt de regulă sferoidali, se formează în
poziţie terminală şi rămîn ataşaţi la forma vegetativă,
dînd bacililor un aspect caracteristic de "ciocănaş de
bătut toba" sau de„rachetă de tenis". Aspecte similare
sînt întîlnite la Cl.tetanomorfus, dar sporii sînt mult
mai mari şi au o formă pronunţată ovalară.

Infrastructura este asemănătoare la toţi sporii.
Protoplastul sporal (celula sporală propriu zisă) con-
ţine materia nucleară (sau nucleoplasma) formată din ADN
cromozomal şi o cantitate relativ redusă de sporoplasmă
cu aspect granular, mult mai densă şi electroopacă decît
citoplasma. Granulele au dimensiuni de cca 10 nm şi re-
prezintă probabil ribozomii. Acest conţinut sporal este
delimitat de o membrană sporală, care constituie tot-
odată stratul intern al peretelui sporal pluristra-
tificat.

Peretele sporal este preponderent de natură
proteică. Are o infrastructură lamelară complexă, în al-
cătuirea sa distingîndu-se trei straturi principale:

- stratul intern, denumit şi intină, reprezintă
membrana sporală propriu zisă (similară membranei cito-
plasmatice);

- stratul median, respectiv cortexul, gros şi
mai puţin dens, cu opacitate electronooptică mai redusă,
conţine mureină modificată;

- stratul extern sau exina este frecvent plu-
ristratificat (format din mai multe "tunici sporale").

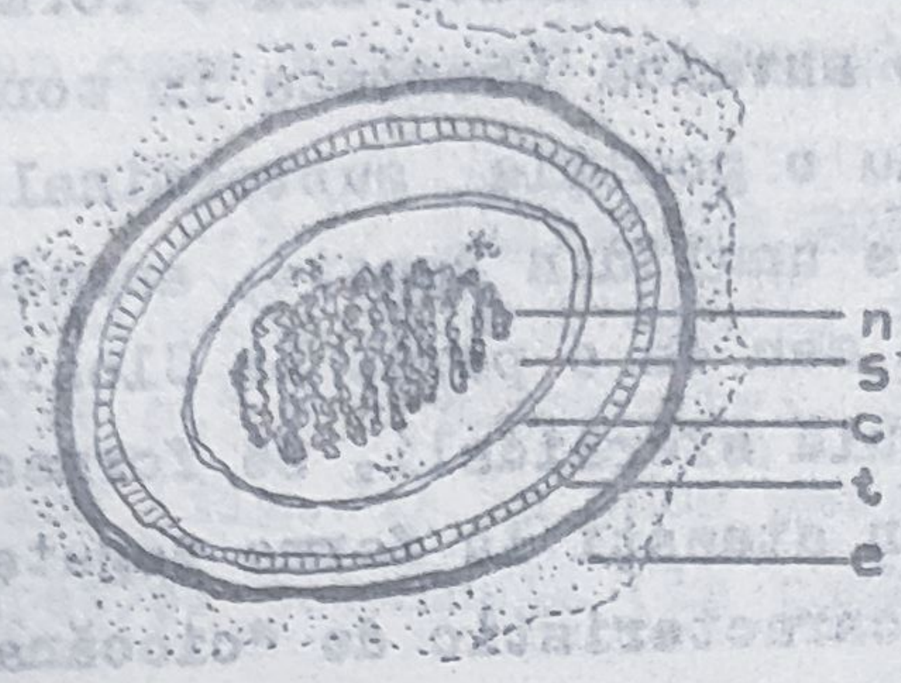


Fig.27.-Reprezentarea schematică a structurii sporului:nucleu(n),sporoplasmă(s);cortexul(c);tunicile sporale(t) şi exosporiumul(e).

Sporii unor bacterii mai pot prezenta un înveliş exterior suplimentar numit exosporium.

Ansamblul acestor caracteristici structurale fac ca sporii să aibă afinităţi tinctoriale diferite de ale formelor vegetative.Ei pot fi coloraţi numai prin metode energetice,care forţează pătrunderea coloranţilor prin perete şi în conţinutul sporal.

Sporii se deosebesc fundamental de formele vegetative prin numeroase alte caracteristici fizico-chimice. Conţin foarte puţină apă liberă, puţine enzime şi o cantitate mult mai mică de ribonucleoproteine: sînt mai săraci în săruri de K şi P, dar mai bogaţi în ioni de Ca, Mg şi Mn şi de 4 - 5 ori mai bogaţi în cisteină. De asemenea, conţin e cantitate apreciabilă de acid dipicolinic (existent numai în spor, în cantitate de cca 1o % din greutatea uscată). Aceasta se găseşte sub formă de sare de Ca, provine probabil din ac. diaminopimelic şi are -se pare - rol în conferirea termostabilităţii enzimelor sporale, la care se leagă şi le dă o configuraţie aparte.

Deosebirile chimice se exprimă şi prin antigenitatea sporilor, care diferă în mare parte de a formelor vegetative.

Cantitatea redusă de apă liberă şi densitatea mare a materiei sporale, dau aparent impresia că sporul este o formaţiune puternic deshidratată. In realitate sporul conţine o cantitate apreciabilă de apă de consti-

tuţie, incorporată în structura unor componente chimice. Există opinia că şi în aceste procese intervine acidul dipicolinic. In consecinţă, deshidratarea aparentă a sporului şi sinteza acidului dipicolinic apar ca fenomene biochimice specifice sporogenezei.

Sporii nu desfăşoară o activitate metabolică şi nu au schimburi de substanţe cu mediul. Enzimele pe care le conţin în cantitate redusă sînt sub o formă inactivă. In schimb, conţin enzime catalitice faţă de alanină în cantitate de 2 - 1o ori mai mari decît formele vegetative, acestea avînd un rol important în procesele de germinare.

2.9.3. Rezistenţa la factorii fizico-chimici

Sporii au rezistenţă mare la numeroşi agenţi fizico-chimici. Se remarcă în special rezistenţa termică mare, sporii fiind distruşi la o căldură umedă de 12o° după 2o - 3o minute, iar la căldură uscată de 16o-18o° după 3o - 6o minute. Sporii unor specii bacteriene pot rezista la fierbere pînă la 1 - 2 ore, în timp ce formele vegetative mor obişnuit în 1o minute la 7o-8o°.

Rezistenţa sporilor este deosebit de mare la uscăciune şi la radiaţii. Ei se conservă şi-şi pot menţine viabilitatea în pămînt şi în diverse materiale patologice, timp foarte îndelungat. De asemenea, sporii de B.anthracis pot rămîne viabili în pămînt timp de peste 7o de ani; sporii unor bacterii saprofite şi-au păstrat viabilitatea în conserve alimentare timp de peste 114 ani. La fel se comportă şi sporii de Cl.tetani. UNGUREANU a constatat că acestia şi-au menţinut viabilitatea într-un cordon ombilical uscat de copil timp de peste 6o de ani.

Sporii sînt, în comparaţie cu formele vegetative, mult mai rezistenţi la substanţele antiseptice şi la dezinfectante. De exemplu, sporii bacililor cărbunoşi

se menţin viabili cîţiva ani în soluţie cu adaus de 40 % - 50 % glicerină, în timp ce formele vegetative sînt distruse în cîteva ore. Sporii unor bacterii rămîn vii pînă la o săptămînă în soluţie de fenol 5 % şi mai multe săptămîni în alcool.

Aceste aspecte subliniază rolul lor biologic, care constă în conservabilitatea îndelungată a viabilităţii germenilor sub o formă latentă, în condiţii de mediu şi de viaţă în care formele vegetative nu pot rezista, asigurînd astfel supravieţuirea germenilor în natură.

2.9.4. Germinarea sporilor. Transformarea sporilor în forme vegetative este un proces complex, care se desfăşoară în strînsă corelaţie cu factorii de mediu, în trei etape succesive: activarea, germinarea şi creşterea formei vegetative noi.

Activarea şi germinarea sînt stimulate de caracterul hidric al mediului şi de prezenţa unor componente chimice uşor metabolizabile. Procesul constă într-o reorganizare rapidă a componentelor sporale. In prima fază se produce o absorbţie intensă şi rapidă de apă, însoţită de creşterea în volum a sporului uneori de loc % şi de pierderea refringenţei. Concomitent, se petrec modificări structurale şi biochimice, în cursul cărora se produce activarea şi îmbogăţirea echipamentului enzimatic cu rol energetic şi plastic. Multe componente sînt degradate şi restructurate în componente noi, unele substanţe specifice sporului fiind eliminate (acidul dipicolinic, anumite peptide, săruri de Ca etc.). Nucleul revine în poziţie centrală, iar în cortexul sporal se produc schimbări esenţiale, finalizate la scurt timp prin ruperea peretelui sporal şi prin apariţia unei emergenţe care creşte rapid, dînd naştere unei noi forme vegetative. Aceasta se desprinde de regulă de membrana

sporală, dar uneori învelişul sporal rămîne ataşat acesteia o anumită perioadă.

Celula nou formată desfăşoară o activitate metabolică deosebit de intensă, creşte şi se divide într-un ritm rapid, vădind parcă un proces de întinerire.

Viteza de germinare diferă în limite largi, în funcţie de specie şi de vechimea sporilor. De exemplu, sporii de B,anthracis recent formaţi, ajunşi în condiţii favorabile, germinează de regulă în 6o- 9o secunde,mîn timp ce germinarea sporilor vechi începe abia după 1-2 ore sau chiar mai mult.

2.9.5. <u>Determinismul genetic.</u> Sporogeneza şi germinarea sporilor sînt procese controlate şi dirijate genetic de aproximativ 5o de gene, situate în cromozom în "locus"-uri diferite. Acestea se menţin în forma vegetativă în stare represată,pînă cînd sub acţiunea unor factori inductori endogeni şi exogeni(de mediu) sinteza represorului încetează. Aşa cum s-a mai arătat, factorii de mediu exercită un rol activant sau inhibant asupra sporogenezei, cît şi a germinării sporilor, procesul de germinare fiind influenţat pozitiv de o temperatură apropiată de cea optimă multiplicării, de umiditate, de diferite substanţe prezente în mediu (glucoză, acizi aminaţi ca L-alanina, ioni de Na, K şi Ca etc.)

2.9.6. <u>Implicaţii ecologice.</u> Bacteriile sporogene sînt caracterizate prin posibilitatea de a duce o viaţă saprofită. Speciile patogene pentru animale şi om se pot conserva timp nelimitat în mediul ambiant, iar unele chiar pot trăi şi se pot multiplica în sol. Sporii acestora ajunşi în organism pe căi accidentale convenabile, pot determina însă infecţii. Datorită acestei caracteristici biologice şi ecologice,, bolile provocate de bacteriile sporogene sînt practic neeradicabile,

dar incidenţa lor poate fi redusă considerabil(antrax, tetanos etc.) prin măsurile imunoprofilactice aplicate în masă şi consecvent.

3. FIZIOLOGIE BACTERIANA

Bacteriile sînt vieţuitoare cu o mare plasticitate şi o largă răspîndire în natură. Pe parcursul evoluţiei lor s-au adaptat la condiţii de mediu şi viaţă mult mai variate decît lumea vegetală. Ca urmare şi sub aspect metabolic lumea bacteriană este mai puţin omogenă, fiind deosebit de diversificată mai ales în privinţa capacităţii de a utiliza componentele existente în mediu ca surse nutritive. S-au conturat astfel numeroase grupe specializate de bacterii, cu caracteristici ecologice şi metabolice foarte variate, care le permit să îndeplinească în natură un rol esenţial în circulaţia complexă a materiei, în sensuri multiple.

In acelaşi timp, cunoaşterea caracteristicilor metabolice are o deosebită importanţă practică; în cultivarea bacteriilor pe medii artificiale, în lucrările de diagnostic, în selectarea de tipuri cu proprietăţi fermentative utile în diferite ramuri industriale etc.

Se poate conchide că, studiul fiziologiei bacteriene reprezintă un capitol important al biologiei generale, de mare interes fundamental şi aplicativ.

3.1. STRUCTURA CHIMICA A BACTERIILOR

Celula bacteriană, deşi de dimensiuni foarte mici, are o structură chimică deosebit de complexă. De exemplu, o celulă de E.coli (de cca 500 x mai mică decît o celulă vegetală sau animală) conţine între 3000 - 6000 tipuri de componente moleculare şi macromoleculare

Aproape jumătate sînt componente anorganice cu molecule mică (H_2O, săruri minerale); restul sînt componente organice moleculare şi macromoleculare; glucide complexe şi precursori (cca 2oo tipuri), lipide (cca 5o tipuri), proteine ($1o^6$ molecule care aparţin la cca 2ooo-3ooo tipuri), multe nucleotide şi macromolecule de ARN, una sau mai multe macromolecule de ADN etc.

Se poate aprecia că, deşi în structura celulei bacteriene se găsesc toate componentele caracteristice materiei vii, bacteriile îşi au totuşi individualitatea lor chimică, deosebindu-se de alte vieţuitoare mai ales prin unele componente chimice macromoleculare care sînt proprii lor.

3.1.1. STRUCTURA CHIMICA ELEMENTARA. In structura celulei bacteriene intră toate cele 11 elemente biogene caracteristice materiei vii: C, H, O, N, P, Ca, Na, Cl, S, Mg. Cantitativ acestea reprezintă 99,9 % din totalul elementelor. Restul de o,1 % sînt oligoelemente: Cu, Co, I, Br, Bor etc. Cele mai multe intră în structura unor enzime şi factori de creştere.

In comparaţie cu alte vieţuitoare, bacteriile sînt în general mai bogate în C şi N (în concordanţă cu bogăţia lor în proteine), dar sînt mai sărace în O şi Ca. De asemenea, conţin cantităţi ceva mai mari de P, Na şi Mg. Conţinutul în elemente chimice variază însă, în anumite limite, de la o specie la alta, iar la aceiaşi specie în funcţie de mediul de cultivare, de starea fiziologică şi de vîrsta celulelor bacteriene etc.

3.1.2. STRUCTURA CHIMICA MOLECULARA SI MACROMOLECULARA. In structura celulei bacteriene intră componente chimice foarte variate, sub formă de apă, săruri, minerale, glucide, lipide, proteine şi acizi nucleici

(ADN şi ARN). Multe componente se leagă între ele formînd complexe macromoleculare caracteristice, fie cu rol structural (mureina, lps etc.), fie cu rol funcţional (enzime, exotoxine etc.)

3.1.2.1. APA. Este componentul predominant cantitativ. Reprezintă aproximativ 75 - 85 % din greutatea umedă a celulei bacteriene. O parte se găseşte sub formă de apă de constituţie, încorporată în structura diverselor componente chimice celulare. Cea mai mare parte se găseşte însă ca apă liberă, conferind mediului endocelular un pronunţat caracter hidric.

In apa liberă celulară se găsesc solvate cantităţi apreciabile de săruri minerale. De asemenea, se găsesc solvate sau în dispersie coloidală numeroase componente metabolizabile sau rezultate din activitatea metabolică. De caracterul hidric endocelular depinde desfăşurarea în bune condiţiuni a întregului metabolism (realizarea schimburilor active şi continui dintre celulă şi mediu, difuziunea enzimelor în mediul endocelular şi spre exterior, eliminarea metaboliţilor, pătrunderea şi difuziunea componentelor utile în metabolismul plastic şi energetic etc.) Totodată, apa liberă participă ca substrat în majoritatea reacţiilor biochimice (hidroliză, oxidoreducere etc.) De altfel, diminuarea conţinutului în apă determină o încetinire a ritmului de desfăşurare a proceselor metabolice. Apa intervine în reglarea echilibrului osmotic endocelular, a pH-ului şi a potenţialului oxidoreductor.

Conţinutul în apa liberă influenţează apoi rezistenţa celulei la unii factori chimici şi fizici, diminuarea ei crescînd rezistenţa bacteriei la uscăciune, temperatură şi la unele substanţe chimice.

3.1.2.2. SARURILE MINERALE. Conţinutul în săruri minerale este cuprins între 2 % - 3o % din greutatea uscată a celulei bacteriene. Cantitatea acestora variază în raport cu specia, cu starea fiziologică a celulei, cu compoziţia chimică a mediului etc. De regulă celulele tinere conţin săruri minerale în cantităţi de 6-7 ori mai mari decît celulele bătrîne.

Dintre componentele minerale cele mai bine reprezentate cantitativ sînt: P, K, Na, Mg, Ca, S, Cl. In cantităţi mai mici se găsesc Zn, Fe, Cu, Mn. etc. Predomină compuşii de P, care reprezintă în medie 45 % din totalul componentelor minerale (la M.tuberculosis pot ajunge pînă la 74 %).

Unii compuşi minerali intră în structura componentelor macromoleculare cu rol plastic; alţii intră în structura enzimelor şi coenzimelor sau îndeplinesc rol de activatori în diverse procese metabolice (Ca, Na, Zn). Constituienţii minerali intervin apoi în numeroase alte procese: asigură reglarea presiunii osmotice endocelulare şi menţinerea echilibrului de membrană, influenţînd permeabilitatea acesteia; contribuie la reglarea pH-ului şi a potenţialului oxido-reductor etc.

Compuşii de P au rol esenţial în metabolismul energetic al celulei bacteriene. In legăturile, fosforice macroenergice ale acestora se pot stoca cantităţi mari de energie, pe care celula o poate elibera în raport cu cerinţele sale.

Bacteriile sînt vieţuitoare care au necesităţi minerale mari şi multiple. Cunoaşterea acestor cerinţe are o deosebită importanţă în practica cultivării germenilor pe medii artificiale, iar în multe cazuri chiar la izolarea şi identificarea unor specii.

3.1.2.3. GLUCIDELE. Bacteriile conţin o cantitate

mare şi variată de glucide (ozide şi poliozide), acestea reprezentînd între 4 - 25 % din greutatea uscată a celulei. Conţinutul lor variază însă cu specia şi starea fiziologică .

Glucidele au rol biologic complex, o mare cantitate fiind utilizată de celula bacteriană ca surse de carbon şi energie. Numeroase glucide formează complexe macromoleculare caracteristice, care intră în structura celulei bacteriene, în special în structura peretelui bacterian şi a capsulei. O parte din glucide pot fi polimerizate şi depozitate în citoplasmă unor bacterii ca materii de rezervă, sub formă de granule de amidon şi glicogen.

Ozidele se găsesc fie libere în curs de metabolizare, fie legate de componente de altă natură. Cele mai frecvente sînt: glucoza (sau derivaţi ca: glucozamina, acidul glucuronic) galactoza, manoza, arabinoza etc. Dintre pentoze, riboza şi dezoxiriboza intră în structura acizilor nucleici.

Poliozidele se găsesc sub formă de polimeri simpli sau complecşi, fiind definite generic ca"polizaharide bacteriene". Dintre polimerii simpli, în citoplasmă pot fi găsiţi amidonul sau glicogenul, care servesc ca materii de rezervă. In peretele celular la B.xilinum a fost identificată celuloza (component care nu poate fi sintetizat de alte bacterii); la M.tuberculosis, C.diphteriae, B.subtilis s-au identificat polimeri de tipul hemicelulozelor, iar la B.anthracis un polimer de tipul chitinei. Unele specii pot sintetiza pentozani (M.tuberculosis, C.diphteriae), arabani (polimer al arabinozei sintetizat de Azobacter chroococcum), dextran (Leuconostoc mezenteroides), fructozan (B.mesentericus), galactan (Aerobacter aerogenes) etc.

In celula bacteriană pot fi găsiţi frecvent polimeri complecşi formaţi din ozide conjugate cu acizi

B.C.U. "Lucian Blaga" Cluj-Napoca

uronici: acidul hialuronic care intră în structura capsulei la streptococi, polizaharidele capsulare la pneumococi etc. Unele glucide se leagă cu anumite polipeptide formînd polimeri complecşi cu rol structural, cum este, de exemplu, mureina din structura peretelui bacterian. Alte glucide formează cu diverse lipide complexele lipopolizaharidice (lps) prezente în peretele celular la bacteriile Gram-negative, constituind antigenii "O" şi endotoxinele acestora.

Multe "polizaharide" extrase din celula bacteriană au caracter de antigeni incompleti sau haptene (pot intra în reacţie cu anticorpii, dar nu pot induce sinteza lor). In celulă acestea se găsesc însă legate de alte complemente, de regulă proteice, cu care formează antigeni compleţi (proteinele conferă complexului suportul material al antigenităţii, iar glucidele au rolul de grupări active purtătoare ale specificităţii antigenice).

3.1.2.4. LIPIDELE. Diferă cantitativ în limite largi de la o specie la alta, ele reprezentînd între 2 - 40 % din greutatea uscată a celulei. Bacteriile cele mai sărace în lipide par să fie stafilococii (2,8 %), iar cele mai bogate în lipide bacteriile din genul Mycobacterium.

Conţinutul în lipide variază la aceiaşi specie în funcţie de vîrsta celulelor şi de compoziţia chimică a mediului. De exemplu, la M. tuberculosis (var.hominis), bacilii din culturile tinere,de lo zile, conţin lipide în proporţie de 24,7o %, în timp ce bacilii din culturile vechi, de loo zile, pot conţine lipide pînă la 4o,9o % din totalul componentelor celulare. Acumularea lipidelor în celulele bătrîne este considerată, de altfel, ca un semn de degenerescenţă.

La unele specii bacteriene lipidele se pot acumula

în celulă şi ca materie de rezervă, mai ales cînd germenii sînt cultivaţi în condiţii restrictive(pe medii bogate în C şi în surse energetice, dar sărace în N) sau pe medii cu o anumită compoziţie chimică. De exemplu, celulele de E.coli, dacă sînt cultivate pe medii cu alanină conţin o cantitate dublă de lipide, în comparaţie cu celulele bacteriilor cultivate pe medii care conţin cisteină. De asemenea, conţinutul în lipide este crescut la bacteriile cultivate pe medii cu adaus de glicerol, glucoză etc.

Lipidele bacteriene sînt în general foarte variate, o parte găsindu-se sub formă de compuşi esterificaţi cu alcooli. Multe lipide reprezintă pentru celula bacteriană o importantă sursă de C şi energie. Unele îndeplinesc rol structural, cum sînt cele din peretele bacteriilor Gram-negative şi din peretele bacteriilor acido-rezistente. Fosfolipidele intră în structura membranei citoplasmatice.

Unele lipide au rol în structura bacteriană. De exemplu, "lipidul A", din complexele lipopolizaharidice ale bacteriilor Gram- negative, este un component toxic, conferind complexului caracterul de endotoxină, cu rol în patogenitate.

Mai bine cunoscute sînt lipidele conţinute de M.tuberculosis, acestea fiind formate din diferiţi acizi graşi ca: ac.butiric, ac.palmitic, ac.stearic, ac.linoleic, ac.micolic (de care depinde în mare parte caracterul de acido-rezistenţă şi unele proprietăţi de virulenţă), acid tubercolo-stearic (exercită o acţiune iritativă), acid ftioic (intervine probabil în geneza leziunii tuberculoase etc.).

In general, lipidele bacteriene pot fi grupate în trei categorii:

a). <u>lipide neutre</u>, unele acumulîndu-se în celulă ca materie de rezervă, sub formă de <u>polimeri ai acidului</u>

<u>betahidroxibutiric</u>;

b). <u>ceride</u>, formate prin esterificarea acizilor graşi cu greutate moleculară mare cu alcooli. Sînt conţinute mai ales de bacteriile acido-rezistente în proporţii de 5 - 10 % din greutatea lor uscată. Lipsesc sau se găsesc în cantităţi reduse la bacteriile neacido-rezistente;

c). <u>fosfolipidele</u>, bine reprezentate cantitativ la toate bacteriile (conţin acizi graşi, alcooli, baze azotate şi acid fosforic). De exemplu, la enterobacterii fosfolipidele reprezintă pînă la 50 % din totalul lipidelor; lipidele din complexele lps sînt, de asemenea, fosfolipide în proporţie de 80 - 95 %.

3.1.2.5. <u>PROTEINELE</u> . Bacteriile sînt foarte bogate în proteine, acestea reprezentînd în medie 60 % din greutatea lor uscată. Se apreciază că într-o celulă există cca. 10 molecule proteice, aparţinînd la 2000 - 3000 tipuri. Variaţiile cantitative şi calitative sînt în general restrînse, dependente mai ales de starea fiziologică a celulelor bacteriene.

O mare parte a componentelor proteice intră în structurile celulare, altele se găsesc în stare de dispersie coloidală în mediul citoplasmatic, fie sub forma unor componente în curs de metabolizare, fie ca proteine cu rol funcţional (enzime, exotoxine). Intrucît sinteza proteinelor este controlată genetic şi decurge conform informaţiei înscrise în ADN-ul fiecărei specii bacteriene, se poate afirma că personalitatea chimică şi imunologică a bacteriilor este conferită în special de componentele proteice.

O mare parte a proteinelor sînt combinate sau conjugate cu componente neproteice (lipide, glucide, acizi nucleici sau componente anorganice), formînd cu acestea diferite <u>heteroproteine</u> (nucleoproteine,

metaloenzime, enzime cu grupări prostetice de tipul hemmului etc.), precum şi complexe macromoleculare cu rol structural, (lipoproteine, lps etc.)

3.1.2.6. ACIZII NUCLEICI - ADN-ul se găseşte în celula bacteriană în cantitate relativ constantă la fiecare specie, cuprinsă între 1 - 5 % din greutatea uscată. Cea mai mare parte formează o macromoleculă gigantă, care reprezintă nucleoidul, respectiv cromozomul unic al bacteriei (cu o greutate moleculară de $2,5 \times 1o^9$). In citoplasma se mai pot găsi macromolecule de ADN nesemnificative cantitativ, aceasta formînd plasmidele, respectiv factorii genetici extracromozomali.

ARN-ul. Reprezintă între 1o - 2o % din greutatea uscată a celulei bacteriene (în medie 17 %). Variaţiile sînt dependente în special de starea fiziologică a celulelor. Bacteriile tinere, în plină activitate metabolică, au un conţinut crescut de ARN (în concordanţă cu intensitatea sintezelor proteice).

In raport cu mărimea macromoleculelor de ARN şi cu rolul lor biologic se disting trei tipuri: ARN_m „mesajer" ARN_t sau ARN_s (de transport sau "solubil") şi ARN_r(ribozomal).

ARN_m „mesajer" reprezintă cca 1 % din ARN-ul total al celului. Moleculele sale sînt foarte heterogene ca mărime şi conţinut în baze. Au rolul de a transporta de la cromozom la ribozomi informaţia genetică necesară pentru biosinteza proteinelor. Aceste macromolecule au o viaţă scurtă, de cca 1-2 minute. Celula le degradează rapid, îndată după sinteza polipeptidelor, nucleotidele fiind reutilizate la sinteza unor noi molecule de ARN. Se apreciază că în decursul unei generaţii sînt sintetizate aproximativ 12.5oo - 25.ooo molecule de ARN_m.

ARN_t (ARN_s) (de transport sau solubil) are o

greutate moleculară mult mai mică şi o mare stabilitate. Indeplineşte rolul de a transporta acizii aminaţi din citoplasmă la ribozomi, la locul de sinteză a polipeptidelor.

$\underline{ARN_r}$ (ribozomal) se găseşte în cantitatea cea mai mare, legat de proteinele ribozomale. Semnificaţia sa este încă insuficient clarificată.

3.2. ENZIMELE BACTERIENE

Bacteriile au un echipament enzimatic deosebit de bogat şi variat, care le permite să metabolizeze o mare diversitate de componente organice şi anorganice. Cunoaşterea acestuia are mare importanţă teoretică şi aplicativă. Este suficient să menţionăm că, multe enzime şi căi de metabolizare au fost descoperite şi cunoscute pentru prima dată prin cercetări efectuate pe bacterii.

Din punct de vedere chimic numeroase enzime bacteriene sînt proteine pure; altele sînt proteine conjugate cu diverse componente organice sau anorganice, majoritatea avînd rolul de coenzime[1].

3.2.1. Conţinutul bacteriilor în enzime. Deşi bacteriile sînt vieţuitoare de dimensiuni foarte mici, ele au totuşi nevoie de un echipament enzimatic deosebit de

---

1) Natura chimică a coenzimelor este foarte variată. La bacterii, ca şi la alte vieţuitoare, rolul de coenzimă îl pot avea: fosfopiridinucleotidele (TPN, DPN), adenozinfosfatul (ATP, ADN, AMP) sau componentele la care adenina a fost substituită cu o altă bază, ciclică (guanină, citozină, uracil, hipoxantină), flavin-nucleotidele, adenozil-metionina, ac. tetrahidrofolic, biotina, tiaminpirofosfatul, coenzima A, piridoxalfosfatul, ac. lipoic, grupări prostetice de tipul hemului etc. Prin urmare, în structura multor coenzime intră acidul fosforic, care reprezintă un component foarte valoros, întrucît în legăturile fosforice se înmagazinează cantităţi foarte mari de energie. Asemenea componente au la bacterii un rol major în asigurarea balanţei energetice.

bogat şi variat, care să le satisfacă cerinţele impuse de diversitatea activităţilor metabolice şi vitale. Se apreciază că pentru realizarea metabolismului plastic şi energetic, fiecare bacterie are nevoie pînă la cca 2.ooo tipuri de enzime. Cantitativ, enzimele conţinute de o celulă bacteriană nu pot însă depăşi cifra de cca 1 milion molecule. Fără îndoială că din aceste enzime unele sînt constant bine reprezentate, în timp ce altele sînt supuse unor variaţii cantitative largi, sinteza lor fiind dirijată în funcţie de necesităţi, prin mecanisme biocibernetice de autocontrol şi reglare. Prin mijlocirea acestora celula bacteriană funcţionează cu un sistem biologic perfect echilibrat, în care nu se realizează nici pierderi şi nici procese inutile.

Echipamentul enzimatic nu este absolut identic la toate speciile bacteriene. Unele enzime sînt elaborate numai de anumite specii sau grupe de bacterii. Ca urmare, în privinţa răspîndirii enzimelor la bacterii, ele se împart în două categorii:

- enzime întîlnite la toate bacteriile (dehidrazele, oxidoreductazele etc.);

- enzime întîlnite numai la unele specii sau grupe de bacterii. De exemplu, la bacteriile aerobe: oxidazele, catalazele, peroxidazele, citocromii etc.

3.2.2. <u>Clasificarea enzimelor bacteriene</u>. După natura proceselor pe care le catalizează enzimele bacteriene se încadrează şi ele în cele 6 clase: <u>oxidoreductaze</u>, <u>transferaze</u>, <u>hidrolaze</u>, <u>liaze</u>, <u>izomeraze</u> şi <u>ligaze</u>. Fiecare clasă cuprinde subgrupe în funcţie de legătura chimică scindată sau construită.

Pentru definirea şi clasificarea enzimelor bacteriene ne interesează însă şi alte criterii, în special raporturile pe care le au cu celula şi viteza lor de acţiune.

3.2.2.1. După raporturile cu celula bacteriană enzimele se împart în două categorii: exoenzime şi endo-enzime.

Exoenzimele. Sînt elaborate în celula bacteriană, dar acţionează în afara acesteia, în mediul ambiant. La bacteriile Gram-negative o parte a lor se localizează în spaţiul periplasmatic. Prin urmare, exoenzimele sînt produse celulare difuzibile sau de secreţie. Cele mai multe sînt sintetizate la nivelul polizomilor legaţi de membrana citoplasmatică. Unele exoenzime traversează membrana citoplasmatică pe măsura sintetizării lor.

Difuzarea din celulă este posibilă datorită, pe de o parte, permeabilităţii selective a membranei citoplasmatice şi a porozităţii peretelui bacterian, iar pe de altă parte, a structurii lor mai puţin complexe şi a greutăţii moleculare relativ mici. In general, exoenzimele au funcţii de hidrolaze, fiind capabile să scindeze anumite componente moleculare sau macromoleculare din mediu, pînă la stadiul de metaboliţi care pot pătrunde apoi în celulă. Ele au o masă moleculară pînă la 2o.ooo - 4o.ooo dal, sînt componente lipsite de rigiditate (datorită lipsei de cisteină şi a unor legături S-S-), ceea ce înlesneşte trecerea lor prin membrană. Unele sînt glicoproteine, dar majoritatea sînt formate dintr-un singur lanţ polipeptidic sau din cîteva subunităţi polipeptidice. Traversarea lor prin membrana citoplasmatică şi peretele bacterian sînt în cele mai multe cazuri procese active de transfer. La bacteriile Gram-negative, datorită structurii complexe a peretelui, difuziunea lor spre exterior este limitată în mare măsură şi de aceeia o cantitate apreciabilă se acumulează în spaţiul periplasmatic.

Secreţia exoenzimelor este influenţată în cele mai multe cazuri de concentraţia nutrienţilor în mediul exterior, sinteza lor fiind controlată prin mecanisme

de autoreglare declanşate de regulă prin produsul final, fie prin retro-inhibiţie (feed-back), fie prin represie (prin catabolit).

Unele exoenzime îndeplinesc concomitent şi funcţii de apărare. Ele pot dezintegra componente nocive sau toxice pentru celula bacteriană, prezente în mediu. De exemplu, penicilinaza dezintegrează penicilina, conferind astfel unor bacterii o rezistenţă crescută la antibiotic.

Endoenzimele. Sînt componente nedifuzibile care acţionează endocelular. Majoritatea enzimelor bacteriene fac parte din această categorie. Au de regulă o structură macromoleculară complexă. Multe se găsesc în stare de dispersie coloidală în citoplasmă; altele sînt strîns legate de unele structuri celulare. De exemplu, enzimele respiratorii de tipul citocromoxidazelor sînt în cea mai mare parte legate de membrana citoplasmatică şi de mezozomi, nucleazele de ADN-ul celular, iar enzimele cu rol în sinteza proteinelor în special de ribozomi etc. De aceea, separarea şi cercetarea acestor enzime este mult mai dificilă, putînd fi realizată numai după dezintegrarea celulei bacteriene (prin titurare mecanică, prin ultrasunete, tratare cu lizozimă, bacteriofagi etc.).

3.2.2.2. După rapiditatea de acţiune şi permanenţa în celulă, enzimele bacteriene au fost împărţite de asemenea în două categorii: enzime constitutive şi enzime inductibile (adaptive)

Enzimele constitutive. Un număr apreciabil de enzime sînt componente structurale constante, ele fiind de regulă prezente în celulă indiferent dacă în mediu există sau nu substrat asupra căruia să acţioneze. Ca urmare, cînd bacteriile vin în contact cu substratul metabolizabil, enzimele respective îşi manifestă prezenţa

imediat, acţionînd rapid, prompt.

Enzimele inductibile. Nu toate enzimele sînt prezente permanent - în celulă. Unele sînt sintetizate de către bacterii numai cînd în mediu există substrat metabolizabil şi numai dupa o perioadă de timp relativ apreciabilă, uneori chiar după 2-3 zile de contact a celulelor cu substratul. In consecinţă, acţiunea lor se manifestă tardiv şi lent. De exemplu, Aerobacter aerogenes are capacitatea de a fermenta glucoza şi xiloza. Germenul conţine faţă de glucoză o enzimă constitutivă, prezentă în celulă chiar şi atunci cînd din mediu lipseşte glucoza; faţă de xiloză conţine însă o enzimă inductibilă pe care o sintetizează numai cînd în mediu există xiloză. Dar pentru elaborarea şi sintetizarea acesteia este necesară o perioadă de pregătire a celulei. Ca urmare, glucoza este fermentată rapid, iar xiloza tardiv (după 24-48 ore de contact cu substratul).

Aparent, fenomenul se aseamănă unui proces de adaptare şi, de aceea, mult timp acestea au fost denumite enzime adaptive. Capacitatea de a elabora asemenea enzime reprezintă însă tot o caracteristică genetică, dar care se găseşte în celulă conservată sub o formă "mascată", respectiv reprimată. In acest sens, cercetările au precizat că sinteza enzimelor este un proces indus de prezenţa substratului metabolizabil, care îndeplineşte rol de factor inductor. Substratul inductor interacţionează cu "represorul", determinînd pierderea aviditătii acestuia pentru "operon". Ca urmare, operonul este dereprimat şi intră în acţiune, specificînd sinteza enzimei capabilă să metabolizeze substratul. Din aceste considerente enzimele respective sîntm denumite inductibile, iar procesul de autoreglare" inducţie".

Multe fenomene de inducţie sînt incomparabil mai complexe decît modul sugerat. De exemplu unele inducţii enzimatice pot fi generate de componente asemănătoare

substratului metabolizabil, dar care sînt inaccesibile enzimei. Astfel, la tulpinile de E. coli lactozo-negative se poate induce sinteza betagalactozidazei prin cultivarea germenilor în prezenţa tio-metil-betagalactozidului (component inaccesibil enzimei). In alte cazuri substratul inductor determină sintetizarea în lanţ a mai multor enzime, de regulă a tuturor enzimelor implicate succesiv în metabolizarea unui anumit substrat.

Procesele de "inducţie" demonstrează că celula bacteriană dispune de <u>mecanisme de autoreglare</u>, prin care coordonează şi dirijează ritmul şi intensitatea sintezării multor enzime. Lipsa enzimelor inductibile din celulă, cît timp în mediu nu există substrat metabolizabil, este un fenomen biologic pe deplin justificat. Celula evită astfel sintetizarea inutilă a unor enzime, pentru care ar fi trebuit să consume materie primă şi energie.

Pe de altă parte s-a dovedit că, în anumite condiţii, există posibilitatea de "reprimare" (blocare) a operonilor care specifică sinteza unor enzime din categoria celor "constitutive". De exemplu, dacă bacteriile găsesc în mediul de cultivare histidină, în celulă se blochează căile genetice care specifică enzimele care participă la sinteza acestui acid aminat. Un asemenea fenomen de autoreglare, produs tot de prezenţa în mediu a metabolitului, este denumit "<u>represie</u>".

Blocarea sintetizării unor enzime sau a unor procese metabolice se poate produce însă şi cînd în celulă s-au elaborat şi acumulat cantităţi satisfăcătoare dintr-un metabolit final, fenomenul fiind definit ca <u>retroinhibiţie</u> (blocare prin produs final sau "feed-back".)

In concluzie, bacteriile dispun de mecanisme de autoreglare prin care îşi pot debloca sau bloca temporar căile care dirijează sinteza enzimelor.

Ca urmare, biosinteza enzimelor apare ca un fenomen supus unor procese continui de autoreglare, care îi permit celulei bacteriene să funcţioneze cu maximum de economie şi eficienţă. Din categoria mecanismelor de autoreglare fac parte: inducţia (fenomen de deblocare a căilor genetice care obişnuit sînt în stare reprimată); represia (fenomen de blocare a căilor genetice care se găsesc obişnuit în stare de funcţionare); retro-inhibiţia (fenomen de blocare a lanţului metabolic prin produsul final).

3.3. METABOLISMUL BACTERIAN

Bacteriile sînt capabile să desfăşoare o activitate metabolică deosebit de intensă, dar şi foarte diversificată, în concordanţă cu răspîndirea largă pe care o au în natură şi cu adaptarea la cele mai variate condiţii de mediu şi viaţă. In rîndul lor s-au individualizat, în decursul evoluţiei, numeroase grupe specializate de bacterii care trăiesc din abundenţă în sol, în ape şi nămoluri, în gunoaiele depozitate în platforme, în ape termale, saline, sulfuroase, ferugi-noase, pe diferite substraturi minerale etc. Multe specii bacteriene trăiesc în raporturi şi relaţii strînse cu organismele animale şi vegetale (de comensalism, simbioză, epifitism), iar altele au evoluat spre parazitism, devenind astfel patogene pentru plante, insecte, animale sau om.

Bacteriile utilizează ca substrat nutritiv cele mai variate componente organice şi anorganice prezente în mediu, pe seama cărora îşi satisfac cerinţele plastice şi energetice. Se poate afirma, prin urmare, că bacteriile desfăşoară în natură, peste tot, o activitate metabolică complexă, continuă, uneori lentă şi greu perceptibilă, alteori febrilă şi de proporţii nebănuite,

intervenind activ în transformareu şi circulaţia materiei în sensuri multiple. Lor le revine un rol esenţial în numeroase transformări geochimice, în sol şi ape, dar mai ales în circulaţia C şi N în natură. In acest sens, este suficient să relevăm că în sol şi ape trăiesc grupe specializate de bacterii capabile să metabolizeze N molecular din atmosferă, NH_3, nitriţii sau nitraţii, CO_2, carbonaţii etc., pe care le utilizează ca surse de N şi C. Se apreciază că numai prin activitatea bacteriilor fixateare de N atmosferic se introduc anual în sol şi în circuitul biogen, cca 9 milioane tone azot, sub formă de compuşi accesibili plantelor.

Pe de altă parte, materia organică şi anorganică conţinută de imensitatea cadavrelor vegetale şi animale, cu o structură macromoleculară deosebit de complexă şi inaccesibilă sub această formă regnului vegetal, este degradată în primul rînd de către bacteriile de putrefacţie, bacteriile celulozolitice, pectinolitice, liguinolitice etc., Procesele de degradare sînt continuate apoi de numeroase alte bacterii şi microorganisme, pînă la stadiul de componente mult simplificate şi în mare parte mineralizate, accesibile plantelor prin mijlocirea cărora reintră în circuitul biogen. Prin caracterul şi proporţiile acestor procese geochimice, activitatea bacteriilor în natură se relevă ca o verigă esenţială atît în circulaţie materiei,cît şi în depolusarea şi purificarea permanentă a mediului ambiant. De aceea se poate conchide fără teamă de a greşi că,prin mijlocirea lumii bacteriene natura cunoaşte o continuă refacere înoitoare. Fără activitatea acestor microorganisme viaţa pe planeta noastră ar fi practic imposibilă.

3.3.1. SURSELE NUTRITIVE. Bacteriile sînt caracterizate prin ritm de creştere şi multiplicare, de regulă

mult mai intense decît ale lumii vegetale şi animale, ceea ce reflectă o activitate metabolică neobişnuită. Ca surse nutritive pot fi utilizate toate componentele anorganice sau organice accesibile enzimelor bacteriene.

Trebuie subliniat în mod deosebit faptul că bacteriile au cerinţe energetice foarte mari, pe care majoritatea şi le asigură exclusiv pe seama reacţiilor chimice exoergice şi de aceea sînt definite în general ca <u>vieţuitoare strict chemotrofe</u>[1].

Toate bacteriile utilizează ca substrat nutritiv <u>apa</u>, $\underline{CO_2}$ şi unele <u>săruri minerale</u> (fosfaţi, sulfaţi, ClNa). In privinţa utilizării altor componente există deosebiri mari între speciile şi grupele specializate de bacterii care trăiesc în natură. In general, bacteriile pot utiliza ca surse nutritive componente foarte variate, de la N molecular, CO_2, S, pînă la cele mai <u>complexe substanţe organice</u> de natură protidică, glucidică şi lipidică. Unele specii bacteriene pot degrada şi metaboliza unele substanţe toxice şi antibiotice sau chiar anumite substanţe care prin natura lor chimică diferă esenţial de materia proprie(ac. formic, ac.oxalic, ac.sulfuric, fenolii, celuloza, chitina, lignina, petrolul şi parafinele, cauciucul, substanţele bituminoase şi asfaltice etc.). Se poate conchide deci că, în privinţa surselor nutritive, bacteriile sînt foarte mult diversificate şi că prin mijlocirea unor grupe specializate ele pot metaboliza practic orice substrat organic sau anorganic existent în natură, capabil să le furnizeze energia sau elementele necesare pentru sinteza de materie proprie.

---

1) Fac excepţii cîteva grupe de bacterii fototrofe din hidrosferă, care posedă pigmenţi fotosintetizanţi (bacteriocloroina, bacteriopurpurina) ce le permit să utilizeze energia luminoasă: bacteriile verzi (Chlorobacteriaceae), bacteriile sulfurice roşii (Thiordodaceae) şi bacteriile nesulfurice roşii (Athiorhodaceae).

3.3.2. TIPURI DE NUTRITIE. In raport cu sursele de C şi N şi cu tipul de nutriţie, bacteriile se împart în două categorii: bacterii autotrofe şi bacterii heterotrofe.

3.3.2.1. Bacteriile autotrofe sînt larg răspîndite în sol şi ape şi sînt în totalitate saprofite. Ca tip de nutriţie se apropie mult de regnul vegetal, fiind caracterizate prin faptul că utilizează ca surse de N şi C exclusiv componente anorganice. Ca surse de carbon utilizează CO_2 şi carbonaţii, iar ca surse de N utilizează NH_3, nitraţii şi nitriţii. Pe seama acestora îşi sintetizează materia organică proprie şi îşi procură -total sau parţial - energia necesară. Unele bacterii autotrofe pot metaboliza şi compuşii anorganici ai S.

Bacteriile autotrofe îndeplinesc în natură un rol important în circulaţia C, N, S etc. Unele au o contribuţie majoră la îmbogăţirea solului în compuşi azotaţi. Astfel, bacteriile din g. Nitrosomonas oxidează NH_3 în nitraţi, iar cele din g. Nitrobacter transformă nitriţii în nitraţi. Energia obţinută în cursul acestor procese chimice este utilizată la reducerea CO_2, care le serveşte ca sursă de C (în prima etapă din CO_2 se obţine formaldehidă sau acetaldehidă iar apoi din acestea şi NH_3 sintetizează acizii aminaţi).

3.3.2.2. Bacteriile heterotrofe sînt cele mai numeroase şi cele mai larg răspîndite în natură. Ca tip de nitriţie pot fi considerate cele mai omnivore vieţuitoare. Pentru asigurarea surselor de C, acestora le sînt indispensabile componentele de natură organică, dar multe heterotrofe utilizează concomitent şi CO_2.

Principalele surse de C sînt glucidele (mono, di, tri şi polizaharidele), polialcooli, precum şi diferiţii acizi organici, cetone, lipide, acizi graşi etc. Ca

surse de N sînt utilizate componente azotate foarte variate, anorganice şi organice. De exemplu, unele bacterii heterotrofe pot fixa şi metaboliza N molecular atmosferic; altele metabolizează NH_3, nitriţii, nitraţii (sau alte săruri de amoniu), precum şi compuşii organici azotaţi (uree, acizi aminaţi, polipeptide, protide).

In raport cu particularităţile metabolice, între heterotrofe se individualizează <u>grupul bacteriilor prototrofe</u>. Acestea îşi asigură sursele de C prin metabolizarea carbohidraţilor, iar sursele de N pe seama exclusiv a unor componente anorganice, în special prin metabolizarea N molecular atmosferic. Dintre prototrofe, un rol deosebit de important în natură îl au bacteriile din <u>g.Azotobacter</u> care trăiesc libere în sol şi ape şi bacteriile din <u>g.Rhisobium</u> care trăiesc în sol de regulă în simbioză cu plantele leguminoase, găsindu-se din abundenţă în special în nodozităţile formate pe rădăcinile acestora. Aceste grupe de bacterii îşi asigură cerinţele în N exclusiv prin fixarea N molecular atmosferic. Se formează astfel compuşi azotaţi care îmbogăţesc solul şi servesc plantelor ca surse nutritive. In schimb plantele asigură bacteriilor carbohidraţii necesari ca surse de C.

Din rîndul heterotrofelor fac parte, de asemenea, <u>bacteriile auxotrofe</u>. Multiplicarea acestora este dependentă de prezenţa în mediu a unuia sau a mai multor acizi aminaţi, pe care bacteriile respective nu-i pot sintetiza (monoauxotrofe, dependente de un anumit acid aminat; <u>diauxotrofe</u>, <u>triauxotrofe</u>, <u>poliauxotrofe</u>, dependente de doi, trei, respectiv mai mulţi acizi aminaţi). De exemplu, Salm.typhi necesită prezenţa în mediu a triptofanului, iar Leuconostoc mezenteroides prezenţa în mediu a 17 acizi aminaţi.

Creşterea şi multiplicarea unor bacterii heterotrofe poate fi dependentă apoi de prezenţa în mediu a unor

componente cu rol de factori de creştere, care acţionează ca biocatalizatori: tiamina (vit.B_1), riboflavina (vit.B_2) piridoxina (vit.B_6), biotina (vit.H), nicotinamida (vit.PP) hemina (factorul X), fosfopiridin -nucleotida (factor V). De exemplu, unele specii patogene necesită prezenţa în mediu a unor substanţe organice din sînge (Bordetella, Haemophilus) sau din ser şi lichid amniotic (Meningococcus, Neisseria). La limita extremă a heterotrofiei se găsesc bacteriile parazite endocelular, care necesită substanţe organice complexe existente numai în celulele vii pe care le parazitează.

3.3.3. PATRUNDEREA SUBSTANTELOR NUTRITIVE IN CELULA.

Peretele bacterian este o formaţiune suficient de poroasă, care permite pătrunderea fără dificultate a substanţelor chimice cu o structură moleculară relativ simplă. Complexele macromoleculare trebuie însă să fie în prealabil degradate enzimatic în componente moleculare constitutive.

Pătrunderea substanţelor nutritive prin membrana citoplasmatică este, în general, un proces mult mai complex şi foarte selectiv. Unele substanţe solubile în lipide sau cu molecule în lanţ pot traversa membrana citoplasmatică prin mecanisme nespecifice, strecurîndu-se prin porii reţetei lipoproteice. Alte substanţe, care în mediu se găsesc în concentraţii mai mari decît în celulă, pot pătrunde prin procese de difuziune. Majoritatea metaboliţilor pătrund însă în celulă prin procese de transport selectiv. In aceste cazuri este necesară în prealabil fixarea moleculelor respective pe anumite zone combinante ale membranei citoplasmatice. Transportul prin membrană este mediat apoi de permeaze, care asigură penetraţia substanţelor respective chiar dacă în celulă acestea se găsesc în concentraţie mai mare decît în mediu (de exemplu, beta- galactozid-permeaza asigură

transportul beta-galactozidelor).

3.3.4. METABOLISMUL GLUCIDIC. Pentru majoritatea bacteriilor glucidele reprezintă surse nutritive energetice şi plastice deosebit de valoroase. Căile de catabolizare şi de sinteză a lor sînt deosebit de complexe şi uneori diferite de la o specie la alta, ceea ce creează impedimente în prezentarea unitară a metabolismului glucidic. In principiu trebuie reţinut că ac.piruvic rezultat din catabolizarea glucidelor permite realizarea unor interferări între metabolismul energetic şi plastic, în sensuri multiple. Pornind de la această etapă, în funcţie de calea de metabolizare (oxibiotică, anoxibiotică, fermentativă), se poate ajunge fie la o oxidare completă a substratului, cu formarea de metaboliţi finali (CO_2, H_2O), fie la o oxidare incompletă, cu formarea de metaboliţi intermediari care pot servi apoi ca surse pentru sinteza unor componente proteice şi lipidice proprii celulei bacteriene.

3.3.4.1. Catabolizarea glucidelor. Componentele macromoleculare glucidice sînt dezintegrate de enzimele bacteriene în componentele lor constitutive,prin procese de fosforoliză, la nivelul legăturilor glicozidice, cu eliberarea de energie. Rezultă astfel derivaţi glucidici fosfataţi, cu structură din ce în ce mai simplă, pînă se atinge stadiul de ozide fosfatate, de regulă glucozofosfat.

La cele mai multe microorganisme, catabolizarea glucozei urmează în continuare calea care duce la formarea de ac. piruvic (calea EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS),conform reacţiei globale:

$$C_6H_{12}O_6 + 2NAD + 2ADP + 2Pi \longrightarrow 2\ CH_3CO\text{-}COOH + NADH + 2\ ATP$$

Bacteriile pot utiliza însă alternativ şi alte căi. Astfel, aproape toate bacteriile pot cataboliza glucoza pe calea pentozofosfaţilor sau a "shuntului" hexozo-monofosfaţilor, iar unele grupuri (Pseudomonas, Aeromonas etc.) pe calea ENTNER-DOUDOROFF (calea 2 oxo - 3 dezoxi - 6 fosfo gluconat), obţinîndu-se în final acid piruvic. De aici, catabolizarea poate continua diferit de la o specie bacteriană la alta, pe căi oxibiotice, anoxibiotice sau fermentative.

<u>Catabolizarea oxibiotică a ac.piruvic</u> se poate realiza pe căi foarte complexe. De regulă însă oxidoreducerile sînt complete şi duc la obţinerea de metaboliţi intermediari valoroşi ca surse plastice şi de produşi finali (CO_2 şi H_2O), cu eliberarea unei cantităţi mari de energie calorică.

La bacteriile aerobe metabolizarea acidului piruvic pe cale oxibiotică este impusă de prezenţa în mediu a O_2 (care inhibă metabolizarea pe căi fermentative). Cu participarea CoA şi a altor enzime se produce o condensare între ac.acetic (compus cu doi atomi de C) şi ac.oxalo-acetic (compus cu patru atomi C), rezultînd acid citric (compus cu 6 atomi C). Acesta este metabolizat în continuare pe calea ciclului KREBS (acizilor tricarboxilici).

Metabolizarea glucozei pe cale oxibiotică este mult mai economică şi mai valoroasă pentru celula bacteriană, întrucît permite obţinerea în final a unei cantităţi de 688,5 Kcal, din care numai în ciclul KREBS se obţine 273,5 Kcal, conform reacţiilor:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 6\ CO_2 + H_2O + 688{,}5\ Kcal$$

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + 5\ O \longrightarrow 3\ CO_2 + 2\ H_2O + 273{,}5\ Kcal$$

(ciclul ac.tricarboxilici)

Din aceste considerente cele 10 enzime care cataliz̧ează reacţiile în ciclul KREBS sînt considerate ca enzime respiratorii, iar ciclul ca o fază finală a metabolismului energetic la bacteriile aerobe. Aşa cum s-a menţionat însă ciclul acizilor tricarboxilici poate urma şi o cale inversă, aceasta avînd la bacterii o importanţă mai mare decît la organismele superioare, în special în metabolismul plastic. Produşii intermediari din acest ciclu pot servi mai ales ca precursori ai unor acizi aminaţi (lizină, serină, izoleucină, metionină, alanină, valină, leucină etc.) ,precum şi ca surse în sinteza lipidelor.

Oxidarea piruvatului şi a acetatului poate urma la bacterii şi alte căi, în funcţie de sursele nutritive şi de condiţiile de mediu. O cale importantă de metabolizare o poate constitui, de exemplu, <u>ciclul glioxilic</u>, utilizat de bacteriile din g.Pseudomonas şi g.Escherichia. Acestea utilizează frecvent, ca surse de C., acetatul, etanolul etc., ceea ce impune catabolizarea ac. piruvic prin procese care interesează ciclul ac.glioxilic. Bacteriile respective conţin ca enzime Malat-sintetază şi izocitratază, ceea ce le permite să scindeze ac.izocitric în ac.succinic şi ac. glioxilic, succinatul fiind utilizat apoi la sinteza oxaloacetatului (procesele sînt de fapt mult mai complexe).

Ciclul glioxilic permite nu numai obţinerea de energie, ci şi conversia lipidelor în glucoză (acizii graşi sînt degradaţi la acetaldehidă şi sub formă de acetil-CoA pătrund în ciclul glioxilic şi dau ac.malic).

O altă modalitate de catabolizare a piruvatului o poate constitui <u>decarboxilarea neoxidativă</u> cu formarea de acetaldehidă, care în aerobioză poate fi metabolizată, de către bacteriile din g. Acetobacter pe calea "fermentaţiei" acetice; tot de la acetaldehidă, în condiţii de anaerobioză, metabolizarea poate decurge

în sensul fermentaţiei alcoolice, proces specific unor levuri din g.Saccharomyces, precum şi unor bacterii.

Catabolizarea anoxibiotică a ac.piruvic are obişnuit un caracter fermentativ, cu formarea în final a unor ac.graşi, în funcţie de specie şi de calea de metabolizare. Procesul fermentativ poate avea în consecinţă caracter de: fermentaţie lactică (caracteristică speciilor din g. Lactobacillus şi unor cocci Gram- pozitivi); fermentaţie acetică (caracteristică bacteriilor acetice strict anaerobe); fermentaţie citrică (caracteristică bacteriilor citrice şi Enterobacteriaceaelor); fermentaţie propionică (caracteristică unor bacterii ruminale Gram-pozitive şi lactobacililor); fermentaţie butilică sau butirică (caracteristică unor specii din g.Clostridium) etc.

Se poate conchide că metabolizarea anoxibiotică a ac.piruvic poate urma căi foarte variate, în funcţie de echipamentul enzimatic al bacteriilor.

Merită relevat faptul că, între bacteriile ce conviețuiesc în acelaşi mediu (de exemplu, cele ce conviețuiesc în segmentele tubului digestiv) există obişnuit numeroase legături trofice, în sensul că, metaboliţii finali elaboraţi de o specie servesc frecvent ca surse nutritive altor specii. De exemplu, Enterobacteriaceaele pot cataboliza ac.formic elaborat de unele specii pînă la CO_2, pe trei căi, în funcţie de enzimele care intervin în procese (dehidrogenaza formică, hidrogenliaza formică şi hidrogenaza).Aceleaşi enzime intervin şi în catabolizarea inversă, ceea ce permite, de exemplu, sintetizarea de către E.coli a ac.formic pe baza de CO_2.

3.3.4.2. Sinteza glucidelor. Procesele anabolice urmează de regulă în sens invers căile de catabolizare a glucidelor. Este de remarcat însă că polimerizarea glucidelor în celula bacteriană se realizează obiş-

nuit prin procese de fosforilare a ozidelor, cu participarea ATP, ceea ce permite acumularea în structura glucidelor rezultate a unor cantităţi însemnate de energie. Astfel, polimerizarea glucozei în amidon sau glicogen este precedată de fosforilarea sa, prin participarea ATP (o grupare hidroxilică fiind înlocuită cu o grupare fosforică), obţinîndu-se în prima etapă glucozo-fosfatul; apoi, prin polimerizarea acestuia se obţine energie şi ATP. Procesele decurg schematic astfel:

glucoză + ATP ⟶ glucozo-fosfat + ADP + energie;

n glucozo-fosfat + energie ⟶ (glucozil)n + PO_4H_3 + energie

ADP + PO_4H_3 + energie ⟶ ATP

Cu alte cuvinte, energia eliberată în cursul fosfatării glucozei, prin participarea ATP, serveşte în continuare la polimerizarea sa, din procese rezultînd PO_4H_3 şi energie, ceea ce permite refacerea ATP[1)].

Datorită acestei modalităţi de polimerizare, glucidele depozitate ca materie de rezervă în celulă, sub formă de amidon, sau glicogen, au o mare valoare biologică, în special energetică.

---

1) Cele mai valoroase forme de fosfatare a glucozei sînt din punct de vedere biologic, glucozo - 1 - fosfat şi mai ales glucozo - 6 - fosfat. Ultima formă este de fapt un glucozil-fosfat, care permite polimerizarea prin legături glucozil-glucoză, ceea ce duce la eliberarea PO_4H_3 şi energiei; procesul permite refacerea ATP, din ADP şi PO_4H_3, implicit reînmagazinarea energiei degajate în cursul polimerizării.

3.3.5. METABOLISMUL PROTEIC. Proteinele şi acizii aminaţi sînt pentru bacterii surse plastice şi energetice deosebit de valoroase. Pentru pătrunderea în celulă, proteinele sînt în prealabil hidrolizate prin enzimele proteolitice (proteaze) care le scindează în peptide; acestea, prin peptidaze, sînt apoi degradate la acizi aminaţi. Transportul acestora la nivelul membranei citoplasmatice este mediat de "translocaze" şi "permeaze".

Multe bacterii, în special bacteriile Gram-negative, continuă catabolizarea celor mai mulţi acizi aminaţi, întrucît şi-i pot sintetiza singure, în raport cu cerinţele celulei, Totuşi, şi unele bacterii Gram-negative utilizează şi acumulează în celulă anumiţi acizi aminaţi, prezenţi în mediu sau rezultaţi din catabolizarea proteinelor (valina, metionina, fenilalanina). Bacteriile Gram-pozitive au de regulă posibilităţi mai restrînse de a sintetiza acizi aminaţi şi, de aceea, ele utilizează în măsură mult mai mare acizii aminaţi din mediu, în special ac. glutamic şi lizina, pe care îi acumulează în celulă. Aceştia pot servi apoi la sinteze altor acizi aminaţi şi a proteinelor proprii.

Se poate aprecia, prin urmare că la bacterii există raporturi de dependenţă între procesele de catabolizare şi cele de sinteză a acizilor aminaţi, în sensul că bacteriile care îşi pot sintetiza singure acizii aminaţi, catabolizează în măsură mai mare acizii aminaţi proveniţi din mediu şi invers.

3.3.5.1. Catabolizarea acizilor aminaţi. Procedeele de catabolizare a acizilor aminaţi sînt realizate de către bacterii prin dezaminare sau decarboxilare (similar ca la alte vieţuitoare).

Dezaminarea acizilor aminaţi de către bacterii duce la formarea cetoacidului corespunzător, cu eliberarea de NH_3, aceasta putînd fi utilizat apoi la sinteza

altor componente azotate. Mecanismul dezaminărilor microbiene sînt însă complexe şi doar parţial cunoscute[1)].

O modalitate de dezaminare frecventă la bacterii o constituie <u>transaminarea</u>, mediată de <u>transaminaze</u>, procesele constînd, în esenţă, în transferul grupării NH_2 de la un acid aminat la un α - cetoacid, acesta devenind astfel un nou acid aminat (acidul aminat care pierde NH_2 devine, la rîndul lui, un cetoacid). Un asemenea proces de transaminare reprezintă, pentru cele mai multe bacterii, modalitatea cea mai frecventă de sinteză a unor acizi aminaţi proprii.

<u>Decarboxilarea</u> acizilor aminaţi se realizează în anaerobioză şi este mediată de <u>decarboxilaze</u>. Procesul duce la formarea de amidă, gruparea carboxilică (-COOH) fiind de asemenea scindată, cu formarea de CO_2, conform reacţiei:

$$R\text{-}CHNH_2 - COOH \longrightarrow R\text{-}CH_2 - NH_2 + CO_2$$

(aminoacid) (amidă)

De fapt, decarboxilarea reprezintă la bacterii unul din mecanismele importante de formare a CO_2.

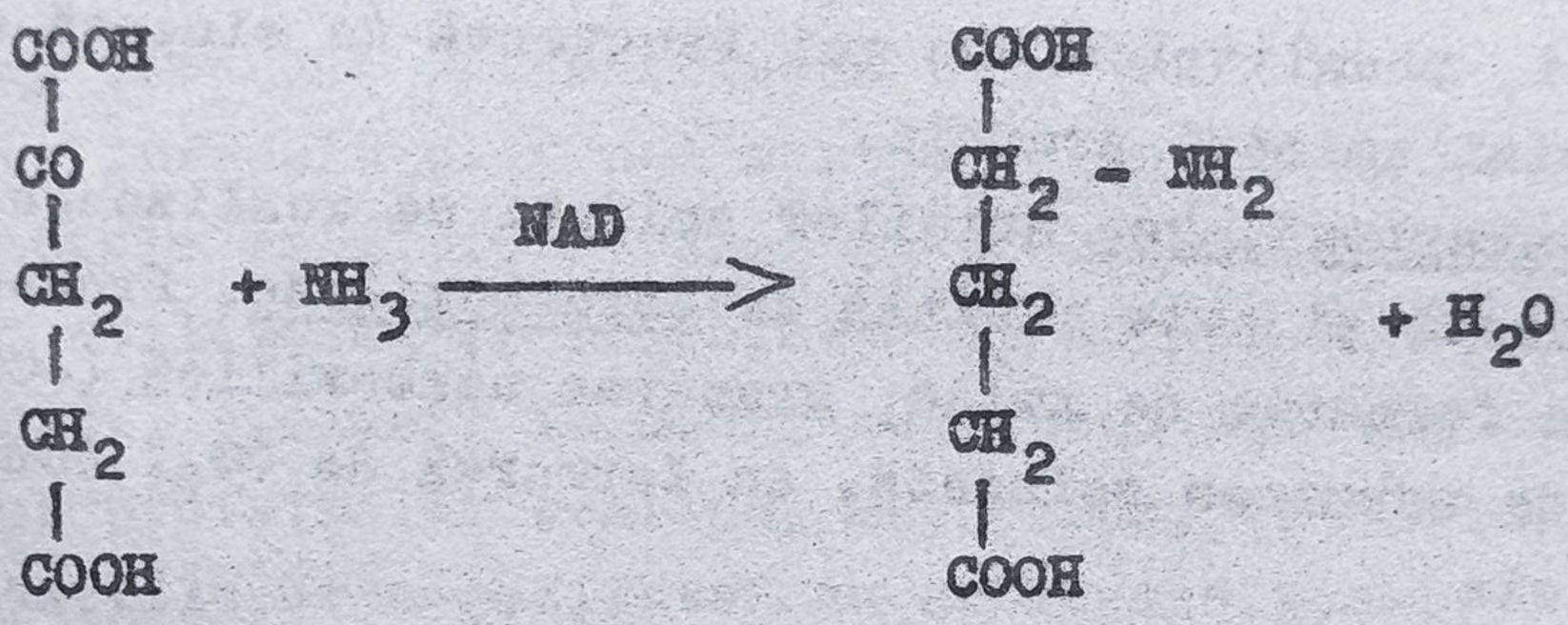
3.3.5.2. <u>Biosinteza acizilor aminaţi şi a proteinelor</u> . Sinteza acizilor aminaţi de către bacterii se poate realiza pe căi multiple, unele încă insuficient cunoscute. Cele mai frecvente modalităţi de sinteză a acizilor aminaţi se realizează însă prin <u>procese de aminare</u> şi <u>transaminare</u>.

---

1) Dezaminarea poate avea următoarele mecanisme:
- <u>dezaminare oxidativă</u>, cu formarea de NH_3 şi cetoacid corespunzător;
- <u>dezaminare reductivă</u>, cu formarea unui acid gras saturat;
- <u>dezaminare desaturantă</u>, cu formarea unui acid gras nesaturat;
- <u>dezaminare hidrolitică</u>, cu formarea unui hidroxiacid.

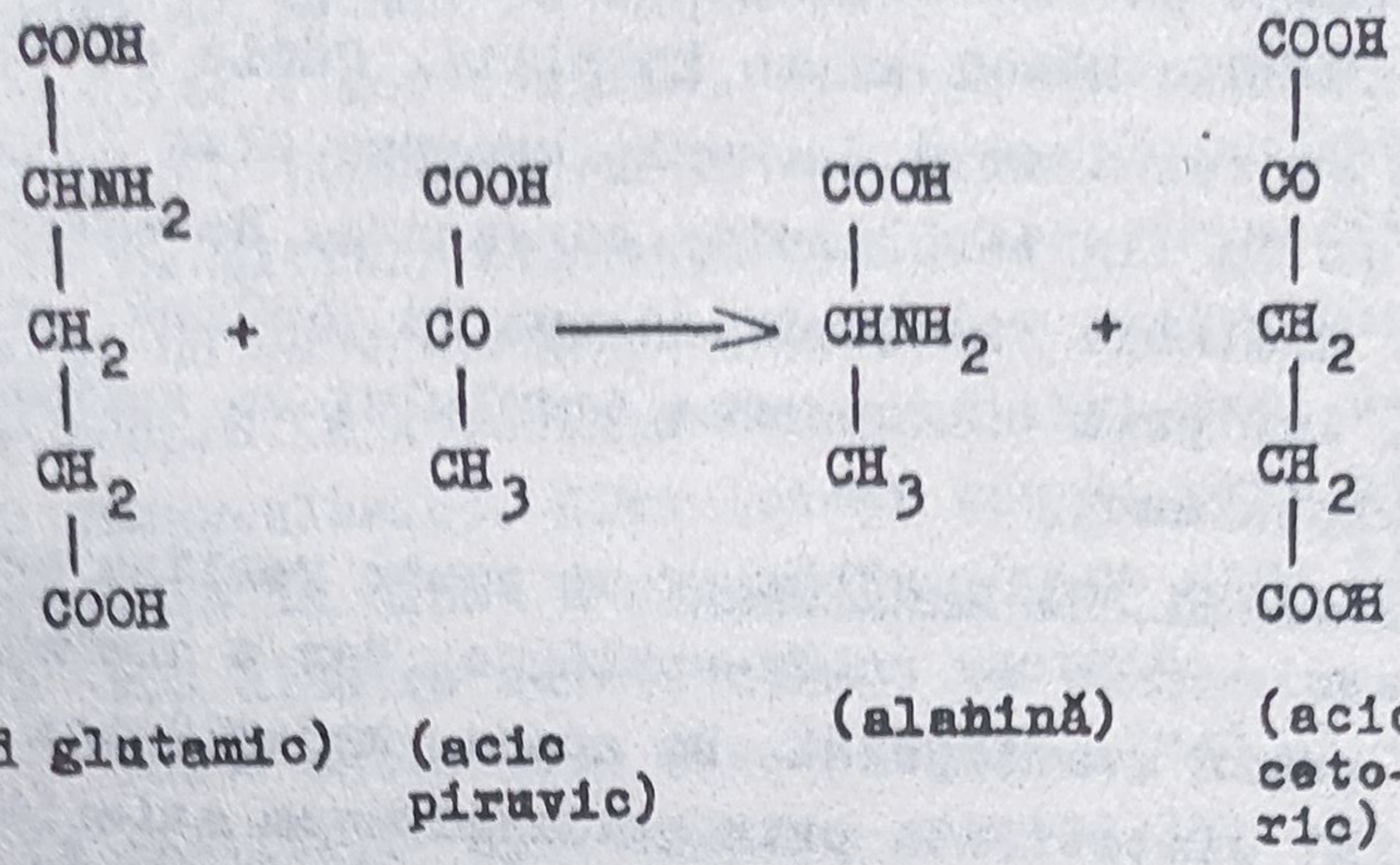
Procesele de sinteză prin aminare pornesc de la metaboliţii intermediari din categoria ceto-acizilor, respectiv de la ac. piruvic, ac. α -ceto-glutaric şi ac. oxalo-acetic, prin aminarea cărora se obţin : alanina, ac.glutamic şi ac. aspartic. In aceste cazuri, sursa de N o constituie compuşii anorganici, în special NH_3.

Sinteza ac.glutamic, prin aminarea ac.α- ceto-glutaric, în prezenţa NAD, decurge schematic astfel:



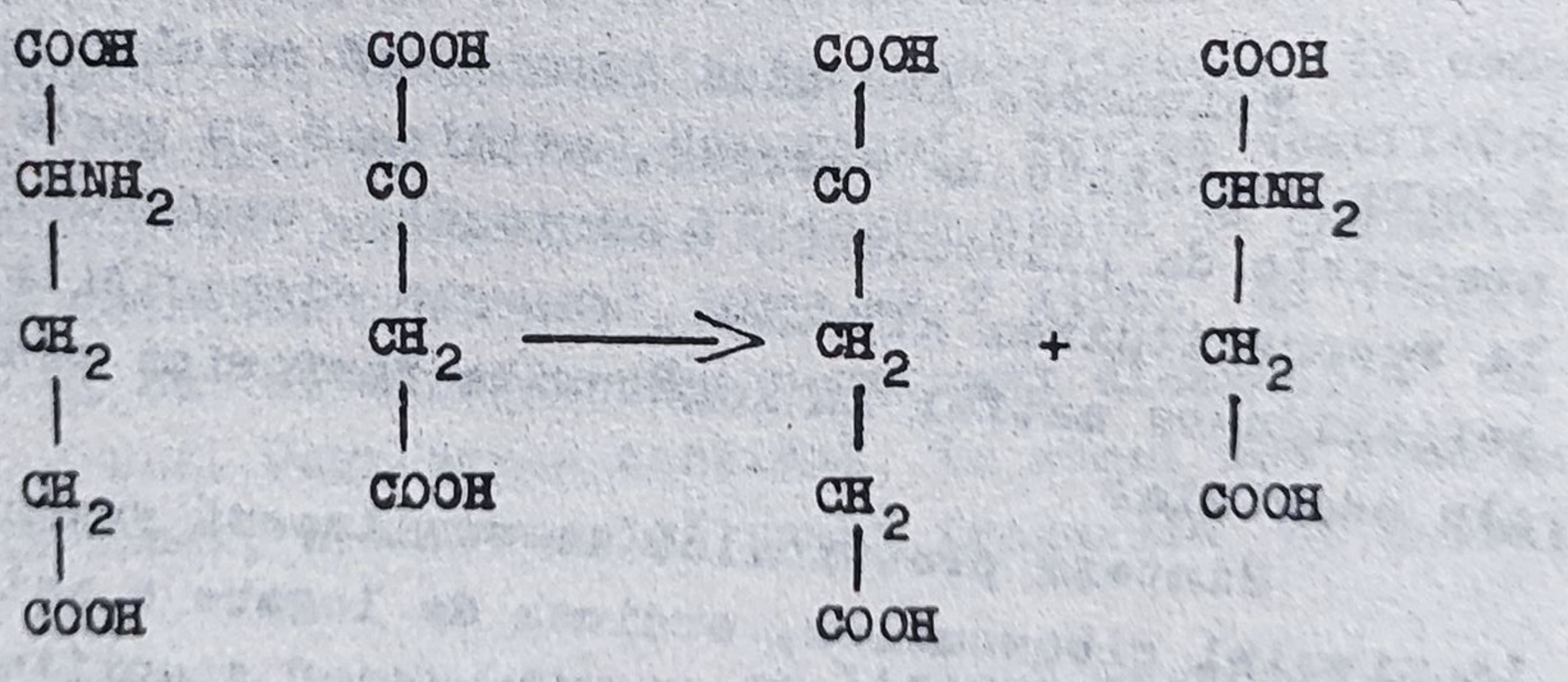
(ac.α-cetoglutaric) (ac. glutamic)

Cei mai mulţi acizi aminaţi sînt sintetizaţi însă prin <u>transaminare</u>, transferul grupării aminice putînd să se facă pe diferiţi cetoacizi. In aceste procese, acidul glutamic are un rol important, întrucît transferul grupării sale aminice la diferiţi cetoacizi poate duce la formarea multor acizi aminaţi. De exemplu, transferul grupării aminice la acidul piruvic duce la formarea alaninei, cu eliberarea acidului glutaric; acesta prin reaminare poate servi din nou la transaminarea altor metaboliţi.



Din aceste considerente se poate aprecia că, la bacterii, sinteza acidului glutamic are o importanţă majoră, constituind principala cale de metabolizare a NH_3, care este incorporat în structura ac.glutamic, iar prin mijlocirea acestuia în structura altor acizi aminaţi şi în final în structura proteinelor.

Analog, prin transaminarea acidului oxalo-acetic se formează ac. aspartic, iar prin transaminarea altor cetoacizi rezultă diferiţi acizi aminaţi. Schema alăturată sugerează un asemenea mod de sinteză.



Acizii aminaţi pot fi obţinuţi în celula bacteriană şi pe calea transformării unora în alţii. Căile şi enzimele prin care se realizează asemenea procese sînt în general complexe şi nu în totalitate cunoscute. De exemplu, de la acidul glutamic se poate ajunge la prolină, ornitină, arginină, iar prin condensarea indolului cu serina se obţine triptofanul.

Sinteza polipeptidelor se poate realiza prin procese enzimatice de transpeptidare, dar o asemenea cale este mai puţin avantajoasă. De aceea, majoritatea proteinelor sînt sintetizate prin polimerizarea acizilor aminaţi, cu participarea de regulă a ATP-ului. Schematic, procesele decurg astfel:

Acid aminat + ATP ⟶ acid aminat — AMP (adenozinmonofosfat) + P-P (pirofosfat) + energie;

n AMP - acid aminat ⟶ lanţ polipeptidic + n AMP + energie;

n AMP + n P-P ⟶ n ATP

Scindarea ATP-ului furnizează celulei bacteriene o mare cantitate de energie, utilizată în parte în procesele de plimerizare (sinteză); excedentul serveşte la reconstituirea ATP-ului, energia disponibilă reînmagazinîndu-se astfel în legăturile fosforice macroergice ale acestuia.

Sinteza proteinelor se realizează predominant la nivelul ribozomilor, ordinea de legare a acizilor aminaţi în lanţul polipeptidic fiind specificată de informaţia genetică transcrisă în ARN_m. Transportul acizilor aminaţi din citoplasmă la ribozomi se face prin moleculele de ARN_t.

3.3.6. METABOLISMUL LIPIDIC.Bacteriile posedă lipaze care le permit să degradeze componente lipidice foarte variate (fosfolipide, acizi graşi, steroli).Cu toate acestea, lipidele au un rol redus în nutriţia bacteriilor. De altfel, prezenţa lipidelor în mediile de cultivare nu este necesară nici chiar pentru bacteriile care conţin în structura lor cantităţi mari de lipide (M. tuberculosis). Sînt totuşi specii care necesită prezenţa în mediu a glicerolului, pe care îl utilizează mai ales ca sursă de C şi energie.

Toate bacteriile sintetizează însă lipide, unele în cantităţi apreciabile, acestea intrînd mai ales în structura componentelor parietale ale celulei. O parte pot fi depozitate în celulă ca materii de rezervă.

Căile de catabolizare şi de sinteză a lipidelor de către bacterii sînt însă mai puţin cunoscute. Probabil că şi la acestea procesele se desfăşoară pe căile metabolice clasice. Ca urmare, scindarea lipidelor de către lipazele bacteriene duce la formarea de acizi graşi şi glicerol.

In funcţie de natura lipidelor catabolizate rezultă diferiţi acizi graşi, de regulă acizi saturaţi cu 14 - 18 atomi de C (în special ac.palmitic şi ac. stearic). Si la bacterii, la catabolizarea în continuare a acestora, un rol important revine acetil-CoA, care activează acidul gras. Fiecare etapă de degradare duce la formarea unui acid gras cu 2 atomi de C mai puţin şi cu eliberarea unui component dicarbonic cu acetil - CoA. Degradarea continuă în acest mod pînă la stadiul final, cînd rezultă numai fragmente de acetil-CoA.

Sinteza lipidelor se realizează probabil prin reacţii inverse, care permit obţinerea unor acizi graşi cu lanţ carbonic lung, pornind de la anumiţi acizi

organici prezenţi în mediu sau rezultaţi din metabolismul celular.

In proces intervine, de asemenea, acetil-CoA, care activează şi transportă acizii organici sub formă de derivaţi de acetil CoA (aceştia pot rezulta, de altfel, chiar ca produşi de oxidare metabolică). Energia necesară sintezelor este furnizată de ATP, conform reacţiei:

Acid organic + acetil-CoA + ATP $\longrightarrow$ acid - acetil - CoA + AMP + P-P + energie. Punerea în libertate a acetil-pirofosfatului (P-P) este însoţită de eliberarea unei cantităţi mari de energie (3000 cal/mol).

Sursele utilizate de bacterii în sinteza lipidelor sînt variate. De exemplu. M.tuberculosis îşi sintetizează lipidele mai ales pe baza surselor de C furnizate de glicocol şi acetat.

Se consideră că principalul punct de plecare în sinteza lipidelor, la toate bacteriile, îl reprezintă mai ales anumiţi metaboliţi proveniţi din ciclul KREBS; un compus dicarbonic acetat (legat cu CoA) de tipul acet-aldehidei şi a acetatului [1], împreună cu ac. butiric activat, duce la formarea buteril -CoA (un cetoacid cu 6 atomi de C) din care rezultă un derivat al ac.gras (ac.capronic); acesta activat în continuare formează, cu o altă moleculă de compus dicarbonic acetilat, un derivat al ac.caprilic (cu 8 atomi de C); printr-un proces similar rezultă apoi ac. caprinic (component cu 10 atomi de C), acid miristic (component cu 12 atomi de C), ajungîndu-se astfel la ac. palmitic şi ac. stearic etc. Procesele decurg probabil similar celor prin care se realizează polimerizarea de către bacterii a ac. beta-hidroxibutiric depozitat în celulă ca mate-

---

1) Acetatul poate rezulta la unele bacterii nu numai prin decarboxilarea oxidativă a piruvatului, ci şi pe seama CO_2 din atmosferă

$$2\,CO_2 + 8\,H \longrightarrow \underset{\text{(acid acetic)}}{CH_3 - COOH} - 2H_2O$$

rie de rezervă.

In final, între acizii graşi astfel formaţi şi unii alcooli se pot petrece procese de esterificare.

Acestea constituie probabil principalele modalităţi de sinteză a tuturor lipidelor bacteriene.

3.3.7. METABOLISMUL ENERGETIC. Bacteriile sînt caracterizate în general ca vieţuitoare chemotrofe, întrucît îşi satisfac cerinţele energetice exclusiv pe seama reacţiilor chimice exoergice. Fac excepţie doar cîteva grupe specializate de bacterii saprofite, care posedă pigmenţi şi pot efectua procese de fotosinteză.

Pe ansamblu, procesele prin care celula bacteriană îşi asigură balanţa energetică pot fi diferenţiate în două categorii: reacţii catabolice şi procese respiratorii. Dintre acestea, reacţiile exoergice cele mai importante au şi fost enunţate, odată cu discutarea căilor şi proceselor de catabolizare a substanţelor organice (glucide, proteine, lipide). Rămîne să facem doar o prezentare pe ansamblu.

3.3.7.1. PROCESELE CATABOLICE SI BALANTA ENERGETICA. In principiu, substratul nutritiv macromolecular este degradat prin reacţii succesive şi pe căi foarte variate, adeseori specifice unor bacterii, pînă la stadiul de metaboliţi intermediari sau produşi finali (CO_2 şi H_2O), fiecare etapă furnizînd celulei bacteriene o anumită cantitate de energie.

Procesele decurg schematic în trei faze.

In faza primă, macromoleculele sînt scindate în componentele moleculare constitutive (polizaharidele în monozaharide, proteinele în acizi aminaţi, lipidele în glicerol şi acizi graşi.) In aceste etape se eliberează o cantitate mică de energie, care reprezintă doar aproximativ 1 % din energia înmagazinată în componentele respective.

In <u>faza a doua</u>, catabolizarea moleculelor continuă pînă în stadiul de metaboliţi intermediari caracteristici căilor metabolice centrale (piruvat, acetil-CoA, trifosfaţi). In cursul acestor procese se eliberează aproximativ 1/3 din energia conţinută în componente.

In <u>faza a treia</u>, care corespunde de fapt proceselor de respiraţie celulară, catabolizarea şi eliberarea energiei se poate realiza pe diverse căi, dintre care cele mai importante sînt:

a). <u>ciclul acizilor tricarboxilici</u>, caracteristic pentru bacteriile care pot duce catabolizarea substratului nutritiv pînă la stadiul de produşi finali (CO_2 şi H_2O). Această cale este cea mai avantajoasă sub aspectul balanţei energetice, întrucît prin oxido-reducerile succesive se eliberează cele mai mari cantităţi de energie. O parte a acesteia este utilizată imediat de celula bacteriană, iar restul se înmagazinează în legăturile chimice macroergice ale unor compuşi noi;

b). <u>calea fermentativă</u>, caracteristică bacteriilor care metabolizează parţial substratul nutritiv, cu formarea în final a unor produşi de fermentaţie (acizi, alcooli). In cursul acestor procese de oxido-reducere se eliberează mai puţină energie, metaboliţii rezultaţi servind - direct sau indirect - ca acceptori sau donatori de H.

3.3.7.2. <u>SURSELE ENERGETICE SI STOCAREA ENERGIEI</u>

Bacteriile sînt foarte diversificate în privinţa componenteler pe care le pot utiliza ca surse energetice. Astfel, unele bacterii autotrofe îşi procură cea mai mare parte a energiei prin oxidarea compuşilor anorganici ai azotului (NH_3, nitriţii), iar altele prin oxidarea unor compuşi anorganici ai Fe, S etc. Din contră, bacteriile heterotrofe utilizează compuşi foarte variaţi anorganici, dar mai ales organici. Dintre heterotrofe,

bacteriile aerobe utilizează cu precădere componentele glucidice şi derivaţii acestora, a căror oxidare poate fi dusă de majoritatea speciilor pînă la stadiul de produşi finali: CO_2 şi H_2O. Procesele de oxido-reducere se pot opri însă şi la stadiul de metaboliţi intermediari (ac. œtoglutaric, ac. fumaric, ac. citric, ac. glicolic, ac. oxalic, etc.) care, pe calea ciclului Krebs sau pe altă cale, servesc apoi în procesele de biosinteză a componentelor proprii (glucidice, lipidice şi proteice).

Bacteriile anaerobe utilizează preponderent, ca surse energetice, componentele proteice şi acizii aminaţi şi în măsură mai redusă glucidele, alcoolii etc. Metaboliţii rezultaţi în cursul acestor procese de oxido-reducere servind apoi succesiv ca substrat donator şi acceptor de H.

Prin urmare, se poate conchide că, la bacterii sursele energetice sînt foarte variate, iar căile de realizare a metabolismului energetic foarte mult diversificate.

Stocarea energiei se realizează şi la bacterii preponderent în legăturile macroergice ale ATP-ului, format prin fosforilarea ADP-ului (aceasta, la rîndul lui, format prin fosforilarea AMP-ului)

Mecanismele de formare a ATP-ului la bacterii sînt însă mai complexe şi variate de la un grup la altul.

Compuşii de tipul ATP-ului constituie o verigă esenţială în reglarea balanţei energetice a celulei bacteriene, întrucît energia stocată în legăturile lor macroergice poate fi eliberată uşor şi rapid, în funcţie de cerinţe. Pe de altă parte, prin aceste componente se asigură o interconectare perfectă între reacţiile oxidative care eliberează energia şi cele de biosinteză care consumă energia.

Trebuie subliniat totodată faptul că, celula bacteriană mai poate stoca energia şi prin încorporarea acesteia în legăturile fosfoergice ale unor polimeri depoziţi în citoplasmă ca materii de rezervă (sub formă de granule sau incluzii de amidon sau glicogen, de acid betahidroxibutiric, de metafosfaţi etc.)

3.3.8. RESPIRATIA LA BACTERII. Ansamblul reacţiilor biochimice de oxido-reducere, prin care celula bacteriană îşi asigură balanţa energetică, fac parte din procesele respiratorii. Conceptul de respiraţie bacteriană devine astfel sinonim celui de metabolism energetic.

Procesele de oxidare biologică pun în libertate o cantitate mare de energie. Utilizarea raţională a acesteia de către celula bacteriană este asigurată, aşa cum s-a arătat, prin două mecanisme:

a) eliberarea fracţionată, în etape, prin oxido-reduceri succesive ale substratului;

b) stocarea excedentului de energie în legăturile chimice ale altor componente;

Procesele de oxido-reducere constau, în esenţă, în dehidrogenarea (oxidarea) substratului, H fiind transportat prin mijlocirea enzimelor la un substrat acceptor care se reduce, In fiecare etapă se eliberează o anumită cantitate de energie, din care celula bacteriană utilizează o parte pentru satisfacerea cerinţelor imediate, iar cealaltă parte o înmagazinează în noi legături chimice de regulă fosfoergice.

3.3.8.1. ENZIMELE RESPIRATORII. Toate enzimele bacteriene care intervin în activarea şi transportul de H, respectiv de electroni, de la un substrat donator la un substrat acceptor, sînt definite generic ca enzime respiratorii. Acestea sînt dehidraze, H fiind transportat de coenzimele lor (care servesc ca acceptori

tranzitorii de H).

După ordinea în care dehidrazele intervin în desfăşurarea procesului respirator şi după natura chimică a coenzimelor cu care se asociază, ele se împart în trei grupe:

- dehidraze piridinice, ale căror coenzime sînt NAD (nicotinadenin-dinucleotid) şi NADP (nicotin-adenin-dinucleotidtrifosfatul), gruparea activă fiind nicotinamida. Aceste coenzime se reduc prin hidrogenare ($NADH_2$; $NADPH_2$); disociază uşor de apoenzimă şi pot servi succesiv la mai multe oxidoreduceri, prin cuplarea lor la alte apoenzime. Asemenea enzime şi coenzime sînt întîlnite la toate bacteriile;

- dixidraze flavinice, care la bacteriile aerobe intervin în transportul de H de la dehidrazele piridinice la citocromi. Sînt enzime flavoproteinice care au în structura lor o grupare prostetică bine fixată, cu rol de cofactor, reprezentată fie de FMN (flavin-nucleotida), fie de FAD (flavin-adenin-dinucleotida);

- sistemul citocromilor, reprezentat de enzime care sînt conjugate cu grupări prostetice de tipul hemului. Acestea realizează transportul de H de la dehidraze, succesiv pe diferiţi citocromi, pînă la O_2 care este acceptorul final de H, ultima etapă fiind mediată de citocromoxidază.

Enzimele din grupul citocromilor sînt caracteristice, şi bine reprezentate la bacteriile aerobe. De exemplu, la B. subtilis şi B. anthracis sistemul de citocromi este reprezentat de tipurile: a, a_3, b, c şi c_1. Bacteriile anaerobe posedă unul sau doi citocromi, iar bacteriile strict anaerobe nu posedă citocromi şi de aceea nu pot utiliza O_2 ca acceptor de H.

3.3.8.2. TIPURI DE RESPIRATIE LA BACTERII. In funcţie de natura acceptorului final de H, reacţiile de

oxido-reducere se pot realiza la bacterii pe trei căi:

a. <u>calea oxibiotică sau aerobă</u>, în care acceptorul final de H este O_2;

b. <u>calea anoxibiotică sau anaerobă</u>, în care acceptorul final de H este un compus de natură anorganică;

c. <u>calea fermentativă</u>, în care acceptorul final de H este un compus de natură organică, acesta fiind de regulă un produs final rezultat dintr-o succesiune de reacţii de oxido-reducere a substratului metabolizabil.

Posibilitatea de a utiliza una sau alta din căi depinde de echipamentul enzimatic pe care îl posedă fiecare specie bacteriană.

In raport cu comportamentul faţă de O_2 lumea bacteriană se împarte în două categorii: <u>bacterii aerobe</u> şi <u>bacterii anaerobe</u>. In cadrul fiecărei categorii se pot individualiza subgrupe sau subtipuri respiratorii: bacterii strict aerobe, microaerofile, capneice şi strict anaerobe, facultativ anaerobe etc. In consecinţă se poate spune că în privinţa căilor şi a surselor de realizare a metabolismului energetic, respectiv a proceselor respiratorii, lumea bacteriană este foarte puţin omogenă.

3.3.8.3. <u>RESPIRATIA LA BACTERIILE AEROBE</u>. Acestea dispun de un bogat echipament enzimatic de tipul citocrom-oxidazelor, care condiţionează realizarea proceselor respiratorii pe <u>cale oxibiotică</u>. Reacţiile constau schematic în oxidarea unui substrat prin intermediul hidrogenazelor, de la care H este transportat la primul citocrom, apoi succesiv pe ceilalţi citocromi. In final, H este fixat pe O_2 activat de oxidaze, cu formarea de apă sau peroxid: Reacţiile decurg după următoarea schemă:

1. Substrat donator de H + dehidrază ⟶ Substrat oxidat + hidrază H_2;

2. Dehidrază H_2 + citocrom ⟶ Dehidrază + citocrom H_2 (a, b, c);

3. Oxidază (fero) + O_2 ⟶ oxidază O_2(feri);

4. Citocrom H_2 + oxidază O_2 ⟶ citocrom + oxidază + H_2O_2.

Bacteriile aerobe pot evita acţiunea toxică a H_2O_2 pentrucă posedă catalaze sau peroxidaze, prin care dezintegrează rapid peroxidul format

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalază}} 2\,H_2O + O_2;$$

$$H_2O_2 + 2\,H \xrightarrow{\text{peroxidază}} + 2\,H_2O.$$

In ultimul caz peroxidul serveşte de fapt ca substrat acceptor de H.

Intensitatea metabolismului respirator la bacteriile aerobe se exprimă printr-un consum mare de oxigen molecular (atmosferic), incomparabil mai mare decît consumul de oxigen al celulelor de origine animală. De exemplu, în timp ce la echivalentul de 1 g ţesut hepatic uscat consumul de O_2/oră este de 2- 5 cm^3, la E. coli consumul se ridică între 1oo - 3oo cm^3 O_2/oră, iar la B.anthracis la 3oo - 9oo mm^3 O_3/minut.

Metabolizarea substratului nutritiv pe cale oxibiotică este calea cea mai avantajoasă. Bacteriile aerobe metabolizează, prin oxidare, în scopuri energetice, numai o parte din substratul nutritiv (cca 5o %), restul fiind convertit în componente structurale proprii, ceea ce asigură o creştere şi o multiplicare celulară deosebit de intensă.

In funcţie de caracteristicile proceselor respiratorii, bacteriile aerobe se diferenţiază în mai multe

subgrupe sau subtipuri respiratorii.

a). bacterii strict aerobe, cum sînt B.anthracis, B.subtilis, M.tuberculosis etc.; acestea se dezvoltă numai în medii cu presiune parţială normală de O (corespunzătoare concentraţiei atmosferice de cca 21 %).

b). bacterii microaerofile (Spirochetales) care se dezvoltă numai în medii cu presiune parţială redusă de O (în concentraţie de regulă sub 1 %);

c). bacterii capneice (Brucella) care necesită o atmosferă îmbogăţită în CO_2 şi concentraţii mai mici de O_2. La acestea CO_2 acţionează ca factor stimulator al metabolismului energetic, dar şi ca sursă de C;

d) bacterii aerobe facultativ anaerobe (E.coli, Staph., Streptococcus etc.) care se dezvoltă optim în condiţii de aerobioză, dar se pot multiplica şi în condiţii de anaerobioză. Un asemenea comportament este determinat de faptul că bacteriile respective îşi pot orienta metabolismul energetic pe calea oxibiotică sau pe cale fermentativă, în funcţie de disponibilităţile mediului în O_2.

3.3.8.4. RESPIRATIA LA BACTERIILE ANAEROBE. Acestea îşi procură energia prin metabolizarea pe cale anoxibiotică a unor compuşi anorganici sau organici.

Activarea de H de pe substratul donator se realizează prin dehidrogenaze; în final H este transferat şi fixat pe un substrat acceptor, altul decît O_2. Ca acceptori de H sînt utilizate diferite componente chimice reductibile, organice sau anorganice; nitraţii, nitriţii, ac.fumaric, ac. ascorbic, cisteina, glutationul, albastrul de metilen etc. Utilizarea acestora ca acceptori de H diferă, la speciile anaerobe, în funcţie de autotrofismul sau heterotrofismul lor.

Metabolizarea pe cale anoxibiotică a substratului

nutritiv este consecinţa faptului că bacteriile anaerobe sînt lipsite de citocromi şi citocrom-oxidază, precum şi de catalază şi peroxidază.

Prezenţa în mediu a O_2 acţionează ca factor nociv, determinînd la unele bacterii anaerobe oxidarea ireversibilă a unor enzime, fapt ce duce la blocarea unuia sau chiar a mai multor căi metabolice. La unele bacterii anaerobe, enzimele flavoproteinice intră în reacţie cu O_2, ceea ce duce la formarea de peroxid (după reacţia: $S-H_2 + O_2 \longrightarrow S + H_2O_2$). In lipsa catalazei sau peroxidazei, H_2O_2 se acumulează în mediu şi acţionează ca un adevărat toxic.

La numeroase specii bacteriene, metabolizarea anoxibiotică a unor compuşi organici (proteine, glucide)se face pe calea fermentativă. In catabolizarea acizilor aminaţi pe această cale intervin de regulă dezaminazele, iar în unele cazuri desulfurazele anaerobe, degradările succesive ducînd la formarea de metaboliţi intermediari, ca ac.piruvic şi ac. alfa-ceto-butaric. NH_3 eliberat în cursul proceselor de dezaminare poate fi utilizat la sinteza altor componente azotate proprii celulei.

Se poate obţine energie şi prin degradarea acizilor aminaţi pe cale fermentativă, cu formarea de acid gras, CO_2 şi NH_3.

Bacteriile anaerobe proteolitice obţin cantităţi importante de energie prin degradarea oxido-reductivă a componentelor proteice macromoleculare. In cazul lor, H rezultat din oxidarea unor acizi aminaţi este transferat şi fixat pe alţi acizi aminaţi. Asemenea reacţii se petrec de regulă între alanină, leucină, valină, fenilalanină, ac. aspartic, ac. glutamic sau chiar între prolină, hidroxiprolină, glicerină etc. Dezaminarea anoxibiotică a acestora duce la formarea de ac.acetic, CO_2, NH_3 (reacţie de tip STRICKLAND).

Unele bacterii anaerobe utilizează nitraţii ca

acceptori de H; reducîndu-i în nitriţi. In asemenea cazuri degradarea unor componente organice poate fi dusă pînă la stadiul de metaboliţi finali (oxidarea completă), cu eliberarea de CO_2, N şi H_2O. De exemplu, în prezenţa de acetat, reacţia de denitrificare decurge schematic astfel:

$$5\ CH_3 - COOH + 8\ NO_3^- \longrightarrow 10\ CO_2 + 4N_2 + 6H_2O + 8\ OH^-$$

Co_2 rezultat din reacţie este, de regulă, reutilizat în procesele de sinteză a altor componente organice.

Unele specii bacteriene pot realiza denitrificarea prin oxidarea S, conform reacţiei:

$$5\ S + 6\ NO_3^- + 2\ H_2O \longrightarrow 5\ SO_4^- + 3\ N_2 + 4\ H^+.$$

La rîndul lor, sulfaţii pot servi ca surse de energie în respiraţia anaerobă a unor bacterii (Desulfovibrio). Pe această cale, oxidarea acidului lactic duce la formarea de CO_2 şi H_2O, conform reacţiei:

$$2\ CH_3 - CHOH - COOH + SO_4^- \longrightarrow 2\ CH_3 - COOH + 2CO_2 + H_2S + 2OH^-$$

Degradarea pe cale fermentativă a unor compuşi organici de către bacteriile anaerobe metanigene se realizează prin procese mai puţin cunoscute, Obţinerea energiei poate fi totuşi înţeleasă prin exemplificarea unor aspecte cunoscute:

$$CH_3 - COOH\ (ac.acetic) \longrightarrow CH_4 + CO_2;$$

$$4\ CH_3 - OH\ (alcool\ metilic) \longrightarrow 3\ CH_4 + CO_2 + 2\ H_2O$$

$$2\ CH_3 - CH_2OH + CO_2 \longrightarrow 2\ CH_3 - COOH + CH_4;$$

$$4\ H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O$$

Aspectele relatate permit să se conchidă că bacteriile anaerobe îşi pot procura energia necesară prin metabolizarea unor componente chimice organice şi anorganice foarte variate, pe căi anoxibiotice şi fermentative multiple. Unele din aceste căi sînt încă parţial cunoscute. Ansamblul enzimelor care intervin în medierea acestor reacţii exoergice acţionează concomitent şi ca enzime respiratorii.

In general, căile anoxibiotice de metabolizare a substratului furnizează cantităţi mult mai mici de energie. De aceea, bacteriile anaerobe utilizează doar o mică parte din substratul nutritiv pentru sinteza componentelor proprii (cca 5 %), cea mai mare cantitate fiind metabolizată pentru obţinerea de energie, metabolitul final acumulîndu-se în mediu ca produs de fermentaţie.

In raport cu comportamentul bacteriilor anaerobe faţă de prezenţa în mediu a O_2 ele se împart în:

a). <u>bacterii strict anaerobe</u> sau oxisensibile, (Cl.tetani, Cl.botulinum etc.), care nu tolerează prezenţa în mediu a O_2, acesta acţionînd ca un adevărat toxic;

b) <u>bacterii anaerobe aerotolerante</u> sau <u>oxitolerante</u> care se multiplică şi în prezenţa unor cantităţi reduse de O_2, putînd fi definite din această cauză şi ca bacterii anaerobe facultativ aerobe.

4. CRESTEREA SI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

Activitatea metabolică deosebit de intensă pe care o pot desfăşura bacteriile se exprimă printr-un ritm foarte rapid de creştere şi multiplicare, neîntîlnit la vieţuitoarele din regnul vegetal şi animal.

Intensitatea de sinteză a materiei vii, manifestată în final prin creşterea numerică a populaţiei bacteriene, poate atinge proporţii nebănuite. In acest sens, unele calcule matematice sînt foarte sugestive. Multe bacterii se divid la intervale de cca 2o minute, respectiv tot la 2o minute apare o nouă generaţie, populaţia bacteriană crescînd astfel în progresie geometrică. Dacă s-ar putea asigura condiţiile care să menţină constant, timp de 48 de ore, acest ritm de multiplicare exponenţială, pornind de la o singură celulă s-ar ajunge la o populaţie de $2,2 \times 1o^{43}$ bacterii. Considerînd că fiecare bacterie are în medie greutatea de $1o^{-12}$ g, greutatea acestei populaţii bacteriene ar ajunge la colosala cifră de 24.ooo.ooo.ooo.ooo.ooo.ooo.ooo.ooo t materie, ceea ce ar reprezenta o masă de cca. 4.ooo de ori mai mare decît a pămîntului (STANIER şi colab.,1966). Cifrele sugerează clar intensitatea extraordinară cu care decurge la nivelul celulei bacteriene sinteza materiei vii.

Un asemenea ritm de multiplicare nu se întîlneşte însă în condiţii naturale, iar în mediile de cultivare are o durată scurtă, limitată de regulă de cîteva ori. Pe plan restrîns, se pot realiza totuşi sisteme de creştere şi multiplicare intensivă a unor bacterii sau levuri, în culturi continui, pe o durată nedefinită în timp, ceea ce permite obţinerea de mase microbiene la scară industrială. In acest mod se prepară, de exemplu, îngrăşămintele bacteriene, drojdia furajeră etc. De altfel, în perspectivă se conturează dezvoltarea unei adevărate

industrii pentru obţinerea unor cantităţi mari de mase microbiene, din care să se prepare produse furajere de mare valoare biogenă, bogate în special în proteine.

Multiplicarea populaţiilor bacteriene este limitată în condiţii naturale de intervenţia multor factori, care menţin lumea microorganismelor într-un echilibru dinamic.

Se întîlnesc rareori condiţii care să permită, chiar pentru scurt timp, o multiplicare exponenţială, datorită în primul rînd faptului că resursele nutritive din mediile naturale sînt limitate cantitativ. Pe de altă,parte, multiplicarea este frînată şi de intervenţia unor factori cum sînt, de exemplu, fenomenele de antagonism care se manifestă pe plan biologic larg între micro-organismele ce conviesţuiesc în acelaşi mediu.

Prin urmare, în condiţii naturale, multiplicarea populaţiilor bacteriene este influenţată de o multitudine de factori adeseori greu de precizat, fenomenul fiind dependent, nu numai de caracteristicile intrinseci ale germenilor şi de existenţa substratului nutritiv, ci de un ansamblu de condiţii de viaţă pe care mediul, în toată complexitatea sa, le oferă diferenţiat fiecărei specii.

4.1. CRESTEREA CELULEI BACTERIENE

Creşterea celulei bacteriene este un fenomen obiectiv, controlat şi dirijat genetic, fiind mai evident la bacteriile care se găsesc în plin proces de diviziune. De altfel, între creştere şi multiplicare există raporturi strînse de dependenţă, în sensul că mărirea celulei bacteriene în volum, pînă la o anumită limită, impune, ca o cerinţă biologică, declanşarea mecanismelor de diviziune celulară.

Prin urmare, la bacterii creşterea şi multiplicarea sînt procese care se desfăşoară într-o corelaţie strînsă, ca un fenomen biologic unitar, în timp ce la alte vieţuitoare (vegetale, animale) creşterea individului este un fenomen distinct de cel de multiplicare. Si la bacterii, creşterea celulei precede multiplicarea, dar procesul în sine este mai puţin evident, devenind semnificativ numai în măsura în care bacteriile se divid şi populaţia creşte numeric.

Creşterea bacteriilor are la bază - evident - sinteza de materie vie, dar şi o intensă hidratare a celulei, volumul acesteia mărindu-se de regulă de cîte ori . Astfel, la Proteus vulgaris, la o mărire în volum de 5 ori îi corespunde o creştere în greutate uscată a celulei doar de două ori.

Procesele de creştere afectează în general toate dimensiunile bacteriei, dar depunerea materiei nou sintetizate se face dirijat şi preponderent spre anumite zone celulare. De exemplu, la bacili creşterea celulei este mai accentuată în direcţia axului longitudinal, aceasta fiind evidenţiată şi de constatarea că lungimea germenilor variază în limite mult mai largi, în comparaţie cu grosimea lor. Chiar şi la unii coci, în plin proces de creştere şi multiplicare, se constată adesea ori o uşoară ovalizare a celulei.

Mărirea în volum a bacteriei implică totodată alungirea şi lărgirea peretelui celular, în special a "sacculuí" mureinic. Unele observaţii atestă că sub acţiunea unor enzime autolitice elaborate de celulă, în structura peretelui se pot forma breşe care apoi sînt completate prin noi unităţi muro-peptidice, care se intercalează şi se organizează pe modelul de structură existent (STOMINGER şi GHUYSEN, 1967). In privinţa zonelor în care se realizează creşterea peretelui celular, se pare că există mai multe modalităţi. La unele

bacterii creşterea se produce preponderent în zona ecuatorială, unde se formează şi septumul de separare a celulelor rezultate din diviziune. La altele creşterea se poate realiza prin bresge diseminate în lungul peretelui, prin depunerea de materie pe toată suprafaţa sau prin creşterea numai în zonele polare.

La multe bacterii creşterea în lungime a celulei şi a peretelui are preponderent caracter unipolar, materia nou sintetizată fiind dirijată şi organizată la unul din polii celulari. O asemenea modalitate de creştere este evidentă, de exemplu, la bacteriile sporulate, la care forma vegetativă rezultată din germinarea sporului creşte prin alungirea polului ce emerge din spor.

Creşterea unipolară are, probabil, unele implicaţii biologice. S-a conturat opinia că celulele rezultate din diviziune nu sînt echivalente ca potenţe biologice, în sensul că procesul de creştere unipolară duce inevitabil la formarea unei celule "mamă", în zona în care se păstrează de regulă organitele celulare vechi şi a unei celule " fiică", în zona de creştere activă, aceasta fiind beneficiară unor organite celulare noi. Ca urmare, celula "fiică" ar putea avea potenţe biologice superioare, exprimate printr-o activitate metabolică mai intensă şi un ritm mai rapid de creştere şi de diviziune, în timp ce la nivelul celulei "mamă" procesele ar decurge mai lent. Probabil că după o serie de diviziuni succesive celulele "mamă" se uzează şi se epuizează treptat, îmbătrînesc şi pînă la urmă mor. Opinia este în concordanţă cu constatarea că într-o populaţie bacteriană, procesele de creştere şi multiplicare nu decurg cu acelaşi ritm la toate celulele. Există celule - probabil "tinere" - cu un metabolism foarte activ şi cu un ritm maxim de creştere şi diviziune, alături de altele care au un ritm mai lent.

Sînt şi celule - probabil îmbătrînite - a căror creştere şi diviziune a încetat complet şi care pînă la urmă mor, chiar şi în perioada cînd populaţia bacteriană se găseşte în faza de multiplicare exponenţială. De aceea, în cinetica populaţiilor bacteriene, ritmul de succesiune a generaţiilor, exprimat prin dublarea numărului de germeni, nu concordă şi nu reflectă matematic ritmul de diviziune a bacteriilor dintr-o cultură, ci doar potenţele medii de diviziune ale populaţiei, în calcul fiind luate şi bacteriile care mor în perioada dintre generaţii.

4.2. MULŢIPLICAREA BACTERIILOR. Bacteriile se înmulţesc obişnuit prin diviziune directă (sciziparitate). Numai excepţional, un număr relativ mic de grupe de bacterii se pot multiplica prin alte modalităţi: ramificare şi înmugurire (actinomicetele şi unele bacterii fotosintetizante), corpi elementari (micoplasme) sau prin spori (unele actinomicete).

4.2.1. DIVIZIUNEA DIRECTA. Creşterea în volum a celulei bacteriene se face numai pînă la anumite limite, procesul fiind urmat imediat de declanşarea diviziunii celulare ca o necesitate a restabilirii raportului optimal dintre suprafaţă şi volum. La bacterii raportul optimal suprafaţă/greutate este de cca. 400.000 ori mai mare decît la om(date citate după ZARNEA, 1970). Suprafaţa foarte mare a celulei bacteriene permite adsorbţia rapidă şi intensă a substratului nutritiv şi, implicit, desfăşurarea în ritm alert a proceselor metabolice. Schimbarea raportului în defavorarea suprafeţei are consecinţe negative asupra nutriţiei. Ca urmare, cînd volumul celulei creşte şi atinge un punct critic, sînt declanşate mecanismele genetice care controlează şi dirijează diviziunea celulară, restabilindu-se astfel raportul optimal (ipoteza LEUCKART - SPENCER). Diviziunea

celulară apare deci ca un proces logic, declanşat de cerinţă biologică de menţinere în limite normale a raportului suprafaţă/volum.

La majoritatea bacteriilor diviziunea se produce la intervale cuprinse, în medie, între 20-30 minute; limitele extreme sînt de 9 minute la B.megaterium şi de 18 ore la Mycobacterium tuberculosis. Procesul constă în scindarea bacteriei în două celule noi, care pot fi aproximativ egale (diviziune izomorfă) sau inegale (diviziune heteromorfă). Formele bacilare şi spirilii se divid obişnuit pe un plan perpendicular pe axul longitudinal. Excepţional, la unii spirili diviziunea celulei se face în lungime, într-un plan paralel cu axul longitudinal. La coci diviziunea se realizează succesiv, pe 1,2 sau 3 planuri perpendiculare, unul pe altul determinate genetic.

Separarea conţinutului endocelular şi a celor două "celule fiice" s-ar putea realiza fie prin <u>strangulare</u>, fie prin <u>septare</u>.

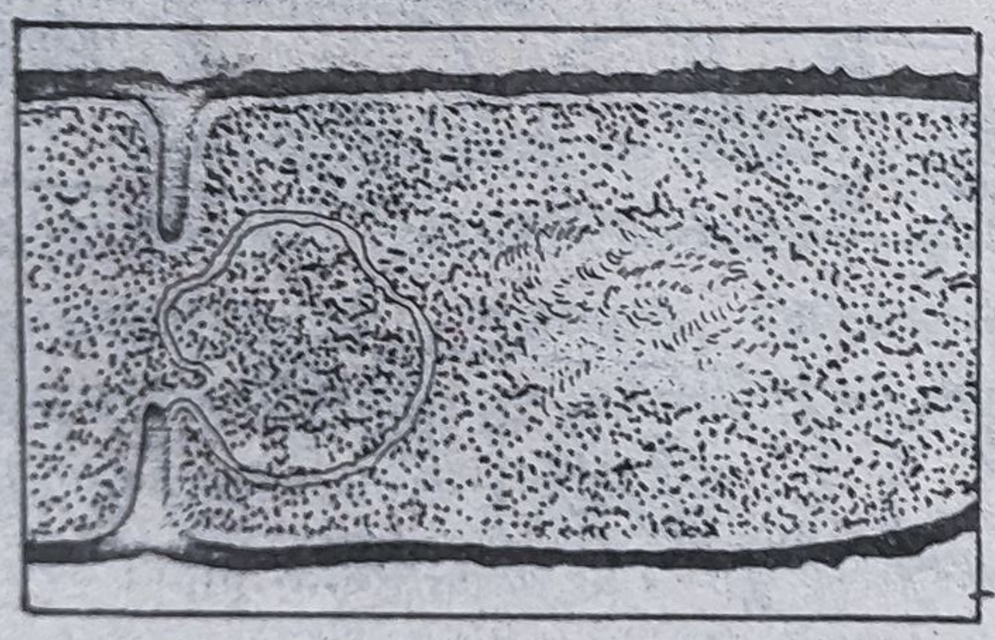


Fig.28.-Constituirea septumului de separare a celulelor fiice, prin invaginarea şi creşterea membranei citoplasmatice şi legătura cu mezozomul.

<u>Diviziunea prin strangulare</u> este caracteristică bacteriilor ce aparţin tipului "S". Procesul constă în invaginarea membranei citoplasmatice în zona ecuatorială a celulei, urmată fidel de invaginarea peretelui bacterian, care în final separă cele două celule (fig.28).

Diviziunea prin centură este caracteristică bacteriilor ce aparţin tipului "R". Procesul se realizează prin creşterea centripetă a structurilor parietale, inițial a membranei citoplasmatice, care formează un sept transversal, separînd astfel conţinutul endocelular. Se produce apoi creşterea peretelui celular, care desăvîrşeşte separarea celor două celule.

Investigaţiile electrono-optice au adus clarificări esenţiale în desfăşurarea fenomenului (RYTER şi colab.1966; SALTON,1967). Septul transversal care separă celulele fiice derivă iniţial din membrana citoplasmatică, prin invaginarea sau creşterea sa centripetă în zona ecuatorială a celulei. La formarea septumului participă şi mezozomul ecuatorial la care se găseşte ancorat aparatul nuclear. Procesul este urmat apoi fidel de creşterea centripetă a peretelui bacterian, care separă septumul derivat din membrana citoplasmatică în două straturi distincte, desăvîrşind diviziunea celulei.

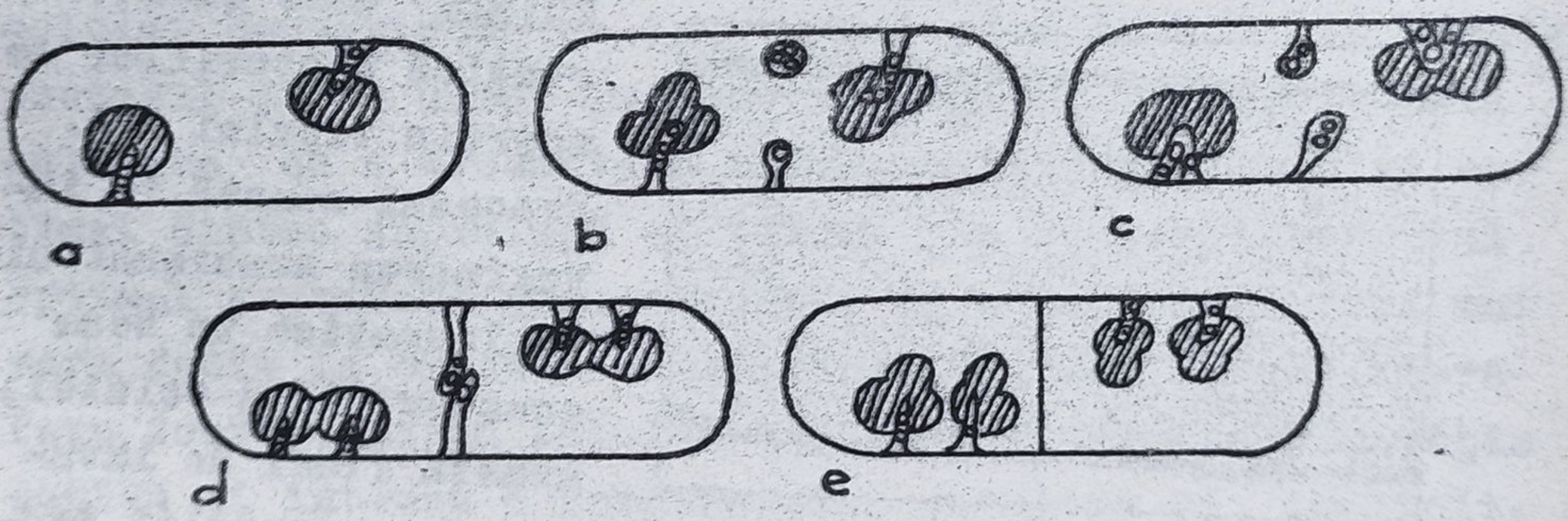


Fig.29.- Reprezentarea schematică a fazelor ce se succed în cursul diviziunii: formaţii nucleare separate, ancordate la mezozomi (a); începerea constituirea septumului (b, c, d); dublarea mezozomului şi replicarea cromozomului (c,d); separarea cromozomilor şi a mezozomilor şi îndepărtarea acestora spre polii celulei (e)(după RYTER, 1965).

Premergător septării se produc procese complexe de restructurare şi reorganizare a conţinutului endocelular. Aparatul nuclear (cromozomul) creşte în volum, se alungeşte şi se divide prin replicarea filamentului de ADN dublu catenar. Se formează astfel două mase nucleare echivalente. Electronografiile executate pe secţiuni ultrafine, prin celulele de B.subtilis în curs de diviziune, au evidenţiat că nucleul se găseşte legat de un mezozom situat în zona ecuatorială a celulei. Odată cu replicarea cromozomului se produce şi o dedublare a mezozomului, fiecare cromozom ajungînd astfel să fie legat de o formaţiune mezozomală proprie. Prin creşterea membranei citoplasmatice şi formarea septumului, în zona de derivare a acestor formaţiuni mezozomale, se realizează treptat separarea şi îndepărtarea lor, odată cu ele fiind separate şi îndepărtate şi cele două formaţiuni nucleare (cromozomale).

4.3. DINAMICA MULTIPLICARII BACTERIILOR IN MEDII LICHIDE

Despre dinamica multiplicării bacteriilor în mediile naturale există relativ puţine date. Cunoaştem însă, în bună parte, natura fenomenelor biologice şi evoluţia numerică a populaţiilor bacteriene cultivate în mediile nutritive lichide.

In cinetica multiplicării bacteriilor în mediile nutritive lichide se disting patru faze : <u>iniţială</u> (de adaptare sau de lag), de <u>multiplicare exponenţială</u> (logaritmică), <u>staţionară şi de declin.</u>

Fiecare fază se caracterizează prin anumite procese biologice, dar mai ales printr-un ritm diferit de multiplicare şi de evoluţie a populaţiei bacteriene. Intre diviziunea celulelor bacteriene şi succesiunea

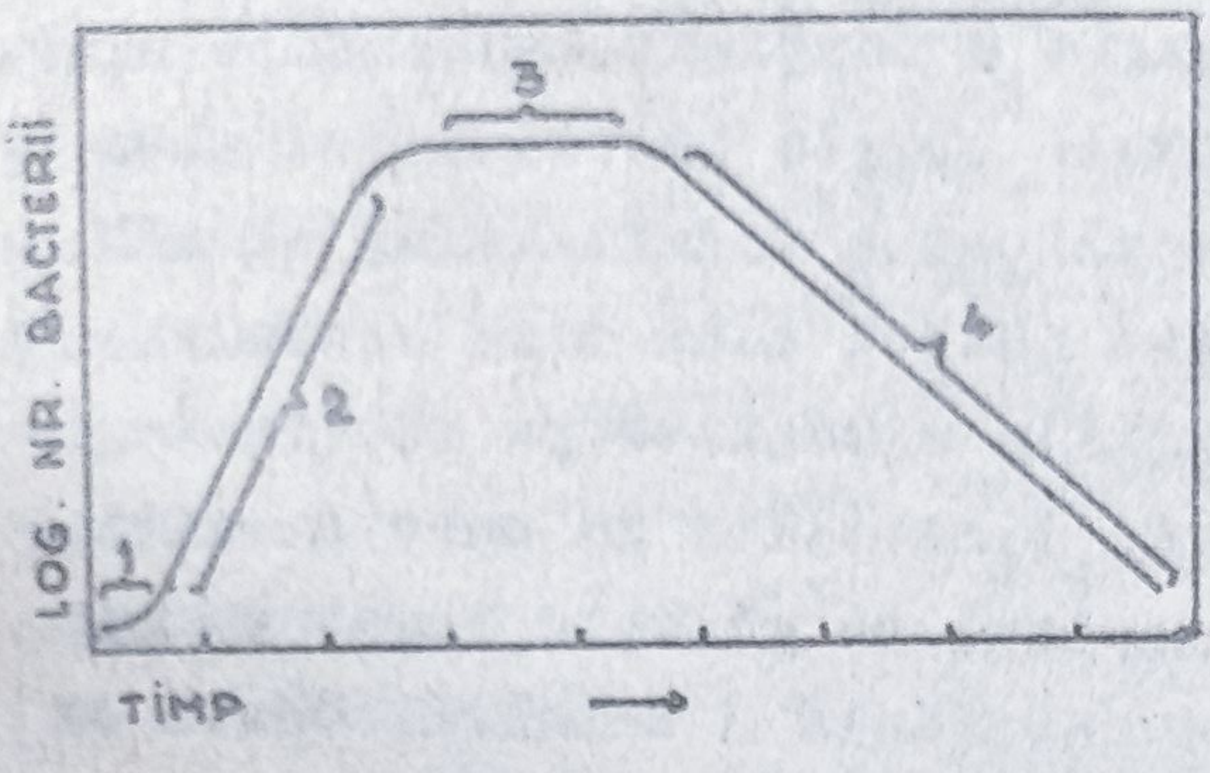


Fig.3o.-Curba multiplicării populaţiei bacteriene în medii lichide: faza de adaptare(1), faza de multiplicare exponenţială sau logaritmică(2), faza staţionară (3) şi faza de declin (4).

generaţiilor există -desigur anumite relaţii de intercondiţionare, în sensul că viteza de diviziune condiţionează rapiditatea de succesiune a generaţiilor, iar numărul germenilor pe unitatea de volum influenţează ritmul de diviziune. Dar, aşa cum s-a mai arătat, între ritmul de diviziune a bacteriilor şi ritmul de succesiune a generaţiilor nu există raporturi matematice absolute, întrucît nu toate celulele unei populaţii bacteriene au aceleaşi potenţe biologice şi ritm de diviziune, ceea ce face ca multiplicarea în ansamblu a germenilor să se desfăşoare nesincronizat. Pe de altă parte, chiar şi în faza de multiplicare exponenţială cînd populaţia are teoretic condiţii optime de viaţă, o parte din germeni mor.

4.3.1. <u>FAZA INITIALĂ</u>, denumită şi <u>faza de adaptare</u> sau de <u>lag</u>, reprezintă timpul scurs din momentul însămînţării germenilor în mediu pînă cînd începe multiplicarea. De regulă, bacteriile însămînţate într-un mediu nutritiv lichid nu încep să se multiplice imediat. Ele trec printr-o perioadă de adaptare la mediu, necesară pregătirii celulelor în vederea multiplicării.

Durata fazei iniţiale este în general, de cîteva ore, dar variază în raport cu specia, cu caracteristicile mediului de cultivare (bogăţia în substrat nutritiv, natura mediului, pH, potenţial oxido- reductor, temperatură

etc.), cu numărul germenilor însămînţaţi şi cu starea lor fiziologică. La E.coli, durata fazei este foarte scurtă, de cca 2 ore; la bacteriile cu ritm lent de diviziune, de exemplu la M.tuberculosis, faza de lag este deosebit de lungă şi poate dura chiar cîteva zile.

In general, perioada de adaptare este cu atît mai scurtă, cu cît mediul şi condiţiile de cultivare sînt mai convenabile, dar şi cu cît numărul germenilor însămînţaţi este mai mare, iar celulele bacteriene mai tinere. Germenii din culturile vechi, cu celule bacteriene îmbătrînite, la transplantarea lor într-un alt mediu necesită o perioadă de adaptare mai lungă decît germenii din culturile tinere. De asemenea, prezenţa în mediu a unor substanţe uşor metabolizabile (cum sînt glucidele simple) duce la scurtarea fazei de adaptare.

In cursul perioadei de adaptare germenii trec prin procese profunde de restructurare morfo-biologică, devenind la finele perioadei apţi să înceapă multiplicarea activă. Adeseori, o parte din bacteriile însămînţate mor, numărul lor fiind cu atît mai mare cu cît mediul este mai puţin favorabil. Unele date atestă că în această fază bacteriile elaborează anumite substanţe difuzibile, cum sînt enzimele inductibile, prin care imprimă mediului transformări utile începerii procesului de multiplicare. In acest sens, cercetările au relevat faptul că mediul suferă modificări care îl fac mai apt pentru cultivarea germenilor. Astfel, dacă la finele perioadei de adaptare germenii sînt eliminaţi din mediu prin filtrare, iar mediul este reînsămînţat cu bacterii din aceiaşi specie, acestea încep să se multiplice mai repede, fără să necesite o perioadă evidentă de adaptare. Experimentul dovedeşte că germenii din primul "inoculum" au realizat modificarea şi pregătirea mediului în vederea multiplicării (TOPLEY şi WILSON, 1955), chiar prin substanţe difuzabile pe care le-au

elaborat şi care au imprimat mediului transformări utile.

Cele mai profunde procese de restructurare se petrec însă la nivel endocelular. In faza de adaptare bacteriile îşi măresc considerabil volumul, ajungînd la finele perioadei la dimensiuni maxime. De exemplu, E.coli creşte în lungime în primele 3 ore de la însămînţare, de la dimensiunile medii de 1,5 micrometri, la 3-4 micrometri, iar B.megaterium de la 3-4 micrometri ajunge chiar pînă la 19,8 micrometri.

Modificările endocelulare demonstrează o intensificare a activităţii metabolice. Altfel, la finele perioadei de lag bacteriile au un consum maxim de oxigen, elimină cea mai mare cantitate de CO_2, elaborează cantităţi mari de azot amoniacal şi de acizi; creşte considerabil conţinutul lor în azot total, în fosfor organic, în ARN şi au cea mai intensă bazofilie etc. Asemenea modificări pot fi interpretate ca un proces de întinerire a celulelor. De altfel, în această fază bacteriile au o permeabilitate crescută a membranei citoplasmatice şi sînt cele mai sensibile la factori fizici (frig, căldură), precum şi la unele antiseptice şi antibiotice.

4.3.2. <u>FAZA DE MULTIPLICARE EXPONENTIALA SAU LOGARITMICA</u>. Se caracterizează prin multiplicarea activă a germenilor, pe parcursul acesteia înregistrîndu-se cel mai intens ritm de diviziune. Creşterea populaţiei se produce în progresie geometrică.

Ritmul de multiplicare şi durata de succesiune a generaţiilor variază însă cu specia şi cu condiţiile de mediu (bogăţia în substrat nutritiv, temperatură, pH, etc.) În general, durata fazei exponenţiale este relativ scurtă. De exemplu, la E.coli durează 6-7,5 ore la 37°C, 11-15 ore la 25°C şi 14 -24 ore la temperatura de 20°C.

Trebuie subliniat însă faptul că ritmul de multiplicare nu este la fel de intens pe toată durata fazei. Inițial, se constată pe o perioadă scurtă de cca. 2 ore, o accelerare progresivă a ritmului de creștere și multiplicare a germenilor; apoi cînd se ajunge la ritmul maxim de multiplicare caracteristic speciei acesta se menține constant o perioadă relativ scurtă, de cîteva ore. Ulterior, ritmul de multiplicare se reduce progresiv și încetează aparent în momentul cînd populația ajunge la o densitate maximă pe unitatea de volum. De exemplu, la E.coli și alți germeni aerobi cultivați în bulion, multiplicarea exponențială durează pînă cînd populația bacteriană ajunge la o densitate de cca 2 x 10^8 celule/ml, iar în culturile intens aerate și agitate continuu, pînă cînd populația ajunge la densitatea aproximativă de 5 x 10^9 celule/ml.

În perioada de încetinire a multiplicării apar și unele desincronizări în diviziunea germenilor, celulele populației găsindu-se în stadii diferite de maturare. De altfel, trebuie remarcat faptul că, deși populația are în faza exponențială potențele maxime de diviziune și multiplicare, totuși aproximativ 2o % din germeni mor, motiv pentru care multiplicarea și succesiunea generațiilor nu decurge de fapt în progresie geometrică absolută.

4.3.3. <u>FAZA STAȚIONARĂ</u>. Cînd pe unitatea de volum s-a atins concentrația maximă de germeni, numărul lor se menține relativ constant o perioadă variabilă de timp. <u>Durata</u> fazei staționare nu depășește la unele specii (Str.pneumoniae, Pasteurella etc.) mai mult de cîteva zile, cel mult 1 -2 săptămîni. La alți germeni faza staționară este mai lungă.

Aparent, deși multiplicarea pare să înceteze, ea totuși se produce discontinuu în proporție redusă

şi numai în măsura în care unele bacterii mor, ele fiind înlocuite de altele noi. Această multiplicare limitativă face ca numărul germenilor pe unitatea de volum să se menţină aproximativ constant pe toată durata fazei.

Factorii şi mecanismele care stau la baza acestui fenomen au fost ampla investigate. Opinia că stagnarea multiplicării ar fi consecinţa epuizării mediului în resurse nutritive a fost infirmată de constatarea că, dacă mediul este debarasat de germeni prin filtrare la începutul fazei staţionare, el este la fel de apt să mai cultive alţi germeni. Încetarea multiplicării bacteriilor pare să fie mai. ales o problemă de spaţiu, prin care să se asigure fiecărei celule cerinţele biologice. Aceste cerinţe nu trebuie însă înţelese şi interpretate mecanic, în sens restrîns, fizic, întrucît ele nu sînt fixe. Experienţele au dovedit că la aceiaşi specie, cerinţele în spaţiu sînt variabile, în funcţie de natura mediului şi de condiţiile de cultivare. Modificarea condiţiilor de mediu, de exemplu, intensificarea aeraţiei (în cazul bacteriilor aerobe) sau adăugarea de glucide fermentescibile, duce la creşterea considerabilă a densităţii germenilor. Astfel, Salm.typhimurium cultivată în bulion în anaerobioză ajunge la o concentraţie de 500 milioane germeni/ml; în condiţii normale de aerobioză numărul germenilor ajunge pe unitatea de volum la aproximativ 2 miliarde; în acelaşi mediu puternic oxigenat densitatea atinge pînă la 8 miliarde bacterii (WILSON, 1930). La fel, în cazul tulpinei B_{19} (Brucella), în condiţii normale de cultivare germenii ajung în faza staţionară la o densitate medie de 5,4 x 10^{10}/ml; în mediile intens aerate germenii ajung însă la densitatea de 1x10^{12}/ml (STERNE, 1958). Asemenea date atestă în esenţă că cerinţele bacteriilor în "spaţiu" trebuie înţelese şi interpretate în sens biologic larg, dinamic, ele fiind dependente direct de condiţiile de viaţă pe care fiecare

mediu le oferă diferenţiat populaţiei bacteriene.

4.3.4. <u>FAZA DE DECLIN</u>. Se caracterizează prin diminuarea progresivă a numărului de germeni, pînă la moartea completă a populaţiei. In anumite momente, o dată cu acumularea excesivă în mediu a metaboliţilor toxici, numărul bacteriilor viabile poate scădea chiar în progresie geometrică.

<u>Durata</u> fazei de declin diferă în limite largi de la o specie la alta. Populaţia unor specii bacteriene (Pasteurella, Streptococcus etc.) moare de regulă în cîteva zile. Din contră, la alte specii bacteriene durata fazei de declin este relativ lungă, de cîteva săptămîni sau chiar luni. Uneori, pe parcursul acestei faze se pot înregistra înmulţiri spasmodice, dar foarte limitate şi trecătoare.

Datorită condiţiilor puţin favorabile de viaţă, în faza de declin apar procese accentuate de polimorfism. Bacteriile iau frecvent forme anormale (mici, sferice, umflate, deformate, gigante, ramificate etc.), considerate ca forme degenerative (de involuţie). De asemenea, se colorează slab şi au afinităţi tinctoriale necaracteristice.

Moartea progresivă a germenilor este consecinţa, pe de o parte a reducerii sau chiar a epuizării mediului în substrat nutritiv, a scăderii tensiunii de O_2 sau a diminuării excesive a compuşilor utilizaţi în respiraţie etc.; pe de altă parte, în mediu se acumulează tot mai mulţi metaboliţi toxici (acizi, alcooli şi alte componente de catabolism), în cantităţi incompatibile cu supravieţuirea.

5. RELAŢIILE DINTRE BACTERIILE ŞI FACTORII DE MEDIU: FIZICI ŞI CHIMICI

Cunoaşterea comportamentului bacteriilor şi a acţiunii pe care o exercită factorii fizici şi chimici asupra celulelor bacteriene, are o mare importanţă teoretică şi practică. Multiplicarea bacteriilor în condiţii naturale sau artificiale este dependentă nu numai de existenţa unui substrat nutritiv adecvat, ci şi de influenţa exercitată de numeroşi factori de mediu: temperatură, radiaţii, presiune hidrostatică, pH, conţinut în săruri minerale şi alte substanţe etc. Mulţi factori fizici şi chimici, cînd se găsesc în cantitate moderată sau optimă, pot exercita o acţiune favorabilă. Din contră, aceiaşi factori, la intensităţi sau concentraţii crescute, pot exercita un efect nociv, bacteriostatic (opresc multiplicarea) sau bactericid. Trebuie subliniat însă că, datorită adaptabilităţii şi a diversificării considerabile a lumii bacteriene, există frecvent deosebiri mari în privinţa comportamentului lor la aceiaşi factori fizici şi chimici. De exemplu, unele specii bacteriene trăiesc şi se multiplică la temperaturi relativ scăzute, iar altele la temperaturi ridicate; unele pot trăi în medii cu o aciditate sau alcalinitate pronunţată; multe specii bacteriene s-au adaptat la condiţiile de mediu din adîncul oceanelor trăind la presiuni hidrostatice foarte mari etc.

Efectele nocive produse de căldură, radiaţii, ultrasunete etc. sînt pe larg utilizate ca mijloc de sterilizare. Efectele nocive exercitate de unele substanţe chimice permite utilizarea lor ca antiseptice şi dezinfectante, iar a altora în chimioterapia infecţiilor bacteriene (sulfamidele şi antibioticele). De aceea, relaţiile dintre bacterii şi factorii de mediu fizici

şi chimici reprezintă un domeniu important al bacteriologiei, cu multiple aplicaţii practice.

5.1. ACTIUNEA FACTORILOR FIZICI

5.1.1. TEMPERATURA. Activitatea metabolică a celulei bacteriene se poate desfăşura numai în limite termice moderate, cuprinse în general între 5°C - 50°C. Din contră, temperaturile extreme au acţiune nocivă.

In privinţa limitelor termice (minime, optime şi maxime) care permit creşterea şi multiplicarea bacteriilor, există însă mari variaţii de la un grup de bacterii la altul. In funcţie de aceste limite, bacteriile se împart în trei categorii: psichrofile, mezofile şi termofile.

5.1.1.1. BACTERIILE PSICHROFILE sau criofile, denumite şi bacteriile frigului, sînt în totalitate saprofite. Se multiplică între limitele termice cuprinse între -10°C - 30°C, temperatura optimă de multiplicare fiind situată sub 20°. Ele trăiesc în natură în apele reci din lacuri şi mări, în pămînt, la altitudini, în zonele arctice. Unele bacterii criofile se multiplică pe alimentele conservate la frig (carne, lapte, fructe, legume etc.) provocînd degradarea şi alterarea lor.

5.1.1.2. BACTERIILE MEZOFILE se multiplică la temperaturi cuprinse între 10°C - 45°C, temperatura optimală de multiplicare fiind în jurul a 37 - 38°C. Din rîndul lor fac parte toate bacteriile patogene şi numeroase bacterii saprofite.

In privinţa limitelor termice care permit multiplicarea există mari deosebiri între specii. De regulă bacteriile patogene care pot trăi şi în afara organismelor animale, în mediul ambiant, se pot multiplica lent la o temperatură minimă de 10°C sau chiar mai puţin

(Staphylococcus sp.la 6°C; B.anthracis la 7° C; E.coli la 8°C etc.) Din contră, bacteriile patogene strict parasite se dezvoltă în limite termice mult mai restrînse, apropiate de temperatura optimală. De exemplu, la M.tuberculosis, tipul uman şi bovin se multiplică între 29°C - 41°C, iar tipul aviar între 35°C - 45°C; gonococul se poate multiplica numai între 3o° - 38°C etc.

5.1.1.3. <u>BACTERIILE TERMOFILE</u> se multiplică în condiţii optime la temperaturi ce depăşesc 45°C. Limitele termice care permit multiplicarea diferă cu specia termofilă. Temperatura minimală care permite multiplicarea unor specii este cuprinsă între 2o°-4o°C, iar temperatura maximală poate ajunge pînă la limite de 7o-8o°C.

Desfăşurarea activităţii vitale la temperaturi atît de ridicate pare să fie posibilă datorită faptului că, proteinele structurale şi mai ales enzimele acestor bacterii au o termostabilitate crescută. Ca urmare, bacteriile termofile îşi desfăşoară activităţile biologice la temperaturi care obişnuit inactivează proteinele altor organisme. Termofilia unor germeni este probabil conferită şi de alte caracteristici structurale. De exemplu, la unele specii (B.stearothermophilus) fosfolipidele celulare sînt aproape în totalitate formate din sfingomieline, al căror punct de topire este mai ridicat decît la fosfolipidele bacteriilor mezofile.

Unele bacterii termofile trăiesc în natură în apele termale, altele pe materiile organice de natură vegetală şi animală, cum sînt gunoaiele depozitate în platforme, furajele însilozate etc. Procesele lor fermentative sînt însoţite de degajări mari de căldură, ceea ce duce la ridicarea temperaturii în silozurile de furaje şi în platformele de gunoi pînă la limite care sînt nocive pentru bacteriile netermofile. De exemplu,

în gunoiul depozitat în platforme temperatura se poate ridica pînă la limita de 7o° - 8o°C, care este letală pentru bacteriile patogene. Pe aceasta se bazează procedeul de sterilizare biotermică a gunoiului provenit din focarele de boală.

Speciile termofile, cum sînt Lactobacillus delbrukii şi L.plantarum, produc în furajele fibroase însilozate fermentarea lactică a maltozei, transformîndu-le astfel în furaje murate cu o valoare nutritivă superioară, cu un gust şi miros aromat, plăcut. Alte specii termofile din genul Lactobacillus sînt utilizate în industria fermentativă a laptelui, la prepararea iaurtului şi a chefirului, la fermentarea unor brînzeturi,etc.

5.1.1.4. TEMPERATURILE SCAZUTE CA FACTOR CONSERVANT

Temperaturile scăzute sînt în general mai puţin nocive, fiind suportate mai uşor de către bacterii. Acestea pot suporta temperaturi extrem de scăzute, ca cele de îngheţare a aerului lichid (-19o°C) sau chiar a heliului (-25o°). Expunerea la asemenea temperaturi joase este totuşi nocivă pentru majoritatea celulelor bacteriene, dar dintr-o populaţie rămîn totuşi viabile o parte din bacterii care, repuse în condiţii favorabile, sînt capabile să se multiplice.

Moartea bacteriilor la temperaturi foarte scăzute este consecinţa denaturării structurilor celulare prin deshidratarea lor, prin formarea de cristale de gheaţă intra şi extracelular, cît şi prin dezechilibrul hidromineral al celulei. Sînt foarte nocive mai ales îngheţul şi dezgheţul repetat. Congelarea lentă, la temperaturi foarte scăzute, este mai nocivă decît congelarea rapidă.

Temperaturile în jurul a 0° produc o blocare a activităţii metabolice, fără să lezeze componentele structurale, în special enzimele, ceea ce permite conser-

varea îndelungată a viabilităţii celulei într-o stare latentă. De exemplu, streptococii, diplococii şi alte specii patogene mor la temperatura camerei, de regulă în cîteva zile, dar la temperatura de 0^{o} - 4^{o}C îşi menţin viabilitatea pînă la 3o zile.

In general, temperaturile de -2o°C pînă la -7o° C permit conservarea optimă a viabilităţii bacteriilor, mai ales dacă celulele sînt supuse concomitent şi la o desicaţie rapidă în vid. Pe aceasta se bazează conservarea culturilor microbiene şi a vaccinurilor vii, prin liofilizare. Procedeul constă într-o sublimare rapidă a apei în vid, din culturile puse pe ghiaţă carbonică, la temperaturi de - 3o° - 8o°C. Asemenea culturi desicate, obţinute sub formă de pulbere, păstrate la + 4^{o}C în fiole închise în vid, îşi pot menţine viabilitatea chiar mai mulţi ani.

5.1.1.5. TEMPERATURILE RIDICATE CA FACTOR NOCIV. Bacteriile sînt mult mai puţin rezistente la căldură. De exemplu, formele vegetative ale bacteriilor patogene (mezofile) sînt omorîte după menţinerea timp de 3o minute la căldură umedă de 5o - 6o°C. Căldura uscată este mai puţin nocivă, formele vegetative fiind distruse în totalitate abea după 1o minute la 1oo°.

Sporii sînt mult mai rezistenţi decît formele vegetative din care provin. Ei pot fi omorîţi numai prin menţinerea timp de 3o minute la căldură umedă de 12o° sau după 3o -6o minute la căldură uscată de 16o - 18o°.

Acţiunea letală a căldurii este consecinţa unor efecte multiple. In general, căldura moderată determină accelerarea proceselor metabolice, mai ales a celor catabolice, ceea ce duce la acumularea rapidă de metaboliţi, urmată de intoxicarea celulei. La aceasta se însumează, la bacteriile aerobe, insuficienţa acută

de O_2 care determină alterări funcţionale asfixice.

Temperaturile ridicate acţionează brutal produ cînd alterări ireversibile ale componentelor endocelulare, cum sînt: denaturarea enzimelor şi proteinelor (fie prin coagularea lor, fie prin ruperea legăturilor intermoleculare în special dintre atomii de carbon); alterarea stării fizico- chimice şi solubilizarea lipidelor citoplasmatice etc.

5.1.2. RADIATIILE. Energia radiaţiilor luminoase, ultraviolete şi a radiaţiilor ionizante (X, gamma etc.) este adsorbită de componentele celulare, în special de proteine şi acizi nucleici, ceea ce poate produce modificări sau lezări grave, unele incompatibile cu viaţa. Gravitatea acestor lezări depinde direct de lungimea de undă a radiaţiilor şi de doza de iradiere şi se exprimă biologic fie ca efect mutagen (cînd iradierea este moderată), fie ca efect letal (cînd iradierea este intensă). Cu cît lungimea de undă a radiaţiilor este mai scurtă, energia radiantă pe care o conţine este mai mare, iar efectele iradierii mai grave.

5.1.2.1. RADIATIILE LUMINOASE (vizibile). Radiaţiile spectrului solar au, în general, efecte sterilizante moderate. Sînt adsorbite de componentele celulare în proporţie redusă. Efectul bactericid este mai ales consecinţa deshidratării celulelor bacteriene, determinată de expunerea mai îndelungată la acţiunea calorică a radiaţiilor infraroşii şi, în mai mică măsură, a radiaţiilor U.V. conţinute de spectrul solar.

Sensibilitatea germenilor la lumina solară variază cu specia, streptococii avînd o sensibilitate maximă, în timp ce stafilococii şi colibacilii sînt mult mai rezistenţi. De asemenea, sporii sînt deosebit

de rezistenţi, în comparaţie cu formele vegetative. De exemplu, la B.anthracis, formele vegetative suspendate într-o picătură de lichid sînt omorîte în proporţie de 9o %, după o expunere de 3o minute la lumina solară, în timp ce sporii expuşi în condiţii identice rezistă pînă la 2 ore.

Acţiunea sterilizantă a luminii solare este influenţată de numeroşi factori. Efectul nociv este mult mai intens la 3o°C, decît la 16°C sau la temperaturi mai scăzute. De asemenea, tratarea bacteriilor cu anumite substanţe colorante (albastru de toluidină, eozină, compuşii acriflavinei etc.) le măreşte sensibilitatea la radiaţiile luminoase, întrucît componentele celulare care au fixat colorantul absorb mai intens energia, ceea ce potenţează efectele foto-chimice. Asemenea substanţe produc prin urmare o fotosensibilizare a germenilor.

Radiaţiile luminoase pot exercita şi alte efecte. De exemplu, ele pot avea un efect foto-protector, cînd bacteriile sînt expuse concomitent la iradierea cu U.V., sau pot avea un efect de foto-reactivare a bacteriilor care au fost expuse în prealabil la iradierea cu doze letale de U.V.(expunerea la lumină poate"repara" alterările celulare produse de U.V, printr-un mecanism încă necunoscut; ca urmare, un număr de celule bacteriene iradiate pot "reînvia", dacă în următoarele ore sînt expuse la lumină). Se poate considera deci că lumina poate exercita, în anumite condiţii, efecte antagoniste faţă de radiaţiile U.V.

5.1.2.2. <u>RADIAŢIILE IONIZANTE</u> (radiaţiile corpusculare alfa, beta, protonii şi radiaţiile electromagnetice X, gamma) au asupra bacteriilor efecte nocive mult mai puternice decît radiaţiile U.V. Efectele nocive sînt produse mai ales de faptul că radiaţiile

ionizante " bombardează" şi "lovesc" o serie de atomi din structura celulei, ceea ce determină desprinderea şi smulgerea de pe orbită a unor electroni. Totodată, ionizarea intensă produce alterarea sau distrugerea unor substanţe esenţiale pentru celulă, blocarea unor enzime, a diviziunii celulare etc. Datorită puterii mari de penetraţie, ele pot provoca alterarea gravă a unor componente structurale, lezarea ADN-ului, transformarea apei celulare în peroxid etc. In funcţie de intensitatea lor, radiaţiile ionizante pot avea efecte mutagene sau letale.

Efectul bactericid cel mai intens îl au radiaţiile X şi gamma. In general, microorganismele sînt mult mai rezistente la iradiere decît mamiferele. Astfel, pentru om este letală o doză de aproximativ 3oo gamma, în timp ce pentru E.coli este letală o doză de aproximativ 1o.ooo gamma, iar pentru levuri dozele de 3o.ooo gamma.

Sensibilitatea bacteriilor este variabilă, bacteriile Gram-pozitive fiind de regulă mai rezistente decît bacteriile Gram-negative.

Datorită efectelor bactericide ale razelor X, beta şi gamma, ele pot fi folosite la sterilizarea unor produse şi materiale sanitare (bandaje, fire de sutură, segmente arteriale), la sterilizarea unor produse alimentare, iar în unele cazuri la inactivarea vaccinurilor.

5.1.3. ULTRASUNETELE. Vibraţiile ultrasonice şi supersonice au efecte letale, determinînd în celula bacteriană fenomene de cavitaţie, manifestate prin dezintegrarea structurilor, însoţite frecvent de ruperea peretelui celular. Sînt mai nocive vibraţiile cu frecvenţă relativ joasă, dar cu intensitate mare.

Sensibilitatea germenilor este variabilă, cocii fiind

în general mai rezistenţi decît bacilii, iar sporii mai rezistenţi decît formele vegetative.

Efectele nocive ale ultrasunetelor pot fi utilizate la sterilizarea unor produse (lapte,etc.). De asemenea, ultrasunetele pot fi utilizate în cercetarea structurii celulei bacteriene pentru obţinerea unor constituienţi chimici şi antigenici, la separarea enzimelor de celelalte componente structurale etc.

5.1.4. PRESIUNEA OSMOTICA. Celula bacteriană, protejată de un perete elastic şi rezistent, suportă variaţii mari de presiune osmotică, dacă acestea nu se produc prea brusc şi în limite exagerate.

In mediile în care presiunea osmotică se abate de la izotonicitate, celula bacteriană suferă anumite modificări caracteristice. Astfel, în mediile hipertonice (de exemplu, în soluţii saline concentrate) celula pierde cantităţi mari de apă, se reduce în volum şi se retractă, membrana citoplasmatică desprinzîndu-se de peretele celular. Se produce astfel o veritabilă ratatinare a celulei, fenomenul fiind denumit plasmoliză. Din contră, în mediile hipotonice, datorită pătrunderii apei în celulă, aceasta devine turgescentă, fenomen denumit plasmoptiză. Cînd capacitatea de distensie a peretelui bacterian este depăşită se produce spargerea celulei şi vărsarea în mediu a conţinutului endocelular.

Nu toate bacteriile sînt la fel de sensibile la variaţiile presiunii osmotice. Multe se pot adapta la medii cu concentraţii relativ mari de săruri minerale. De exemplu, Aerobacter poate fi cultivat în medii a căror concentraţie în săruri variază între 0,1 - 12 %; la fel, stafilococii, B.subtilis etc. se pot dezvolta în medii cu concentraţii mari de săruri, pînă la 8 - 10 %. Din contră, alte bacterii patogene

sînt sensibile. De exemplu, pneumococcii, vibrionul holeric, colibacilii din culturile tinere etc., sînt omoriţi rapid în mediile hipertonice, cu concentraţie de 5 % ClNa. La fel, în mediile hipotonice pneumococii şi meningococcii sînt lizaţi rapid, dar colibacilii rămîn viabili şi după 24 ore.

In general, majoritatea bacteriilor sînt"sensibile" la clorură de sodiu,în sensul că nu suportă concentraţii mai mari de 2 %. Fac excepţie <u>bacteriile halofile</u> (halos = sare; philus = a iubi) din apele marine şi saline care trăiesc în medii cu un conţinut mare de ClNa, pînă la 15 %; unele se pot dezvolta şi în medii cu concentraţii între 16-35 % ClNa (Halobacterium sp). Anumite bacterii halofile se pot dezvolta în produsele conservate prin sare (măsline, peşte sărat, cărnuri saramurate, brînzeturi etc.) Dintre acestea, unele specii sînt utile în "maturarea" produselor respective, dar altele produc degradarea lor.

5.1.5. <u>PRESIUNE HIDROSTATICA</u>. Bacteriile sînt foarte rezistente la presiuni. Există totuşi deosebiri între bacteriile care trăiesc la suprafaţa pămîntului, în organismele animale sau în apele de suprafaţă , faţă de cele care trăiesc în adîncimea oceanelor.Cele din prima categorie sînt considerate <u>baro-sensibile</u>, întrucît activitatea fiziologică şi multiplicarea sînt afectate de presiuni care depăşesc echivalentul a 2oo-6oo atmosfere. Speciile care trăiesc în adîncul oceanelor sînt însă <u>barofile</u>, ele fiind adaptate la presiuni hidrostatice foarte ridicate, care depăşesc uneori echivalentul de looo atmosfere.

5.1.6. <u>GRADUL DE IONIZARE AL MEDIULUI</u> (pH-ul) Concentraţia mediului în ioni de hidrogen şi oxidrili influenţează activitatea vitală şi multiplicarea bacte-

riilor. Majoritatea bacteriilor se dezvoltă în limite relativ largi de pH, cuprinse în general între 6 - 9, ceea ce este echivalent la variaţii ale concentraţiei ionilor de H de l- loco. Această toleranţă se explică prin faptul că, celula bacteriană este puţin penetrabilă la ioni de H şi OH şi, ca urmare, îşi poate păstra reacţia endocelulară la variaţii relativ mari de pH.

In privinţa pH-ului optim şi a limitelor tolerabile există deosebiri mari de la o specie la alta. Cele mai multe bacterii tolerează mai bine un pH alcalin. De exemplu, Pasteurella animalium se dezvoltă în condiţii optime la pH = 8,6, iar unele tulpini de stafilococi se pot multiplica chiar la pH= lo. Mediile acide sînt mai toxice decît cele alcaline. Sînt însă unele bacterii saprofite <u>acidofile</u>, care preferă mediu cu un pH puternic acid. Astfel, bacteriile din genul Thiobacillus trăiesc în apele sulfuroase şi se dezvoltă la un pH optim de 3-4, iar alte specii trăiesc chiar la pH = 0. De asemenea, lactobacilii care produc fermentarea laptelui şi a furajelor însilozate se dezvoltă la un pH acid care atinge obişnuit valori cuprinse între 3 - 5.

5.2. <u>ACTIUNEA SUBSTANTELOR CHIMICE</u>. Bacteriile se găsesc într-o permanentă interacţiune cu substanţele chimice prezente în mediul lor de viaţă. Dintre acestea multe au <u>actiune utilă</u>, stimulînd fie multiplicarea bacteriilor, fie anumite procese metabolice (sinteza unor enzime, toxigeneza, elaborarea de substanţe cu acţiune antibiotică etc.) Alte substanţe au <u>actiune nocivă</u> asupra celulei bacteriene, manifestată fie ca <u>efect bacteriostatic</u> (opresc multiplicarea), fie ca <u>efect bactericid</u> (omoară celula bacteriană).

Incadrarea unor substanţe într-o categorie sau alta este adeseori dificilă şi arbitrară, întrucît utilitatea sau nocivitatea depind direct de concentraţie substanţei în mediu. Astfel, unele substanţe au în concentraţie mică o acţiune utilă, iar în concentraţie mare un efect nociv, de regulă bacteriostatic. De exemplu, zaharoza în concentraţie de 1% poate fi utilizată de multe bacterii ca sursă nutritivă (de C şi energie), în timp ce în concentraţii mari de 4o % exercită un efect bacteriostatic, datorită dereglării echilibrului osmotic. De altfel, pe acest efect bacteriostatic se bazează conservarea dulceţilor.

Pe de altă parte, unele substanţe pot fi utile pentru anumite specii şi nocive pentru altele. De exemplu, H_2S şi CO_2 blochează metabolismul respirator la bacteriile aerobe, comportîndu-se faţă de acestea ca veritabile substanţe toxice, în timp ce alte specii le utilizează ca surse plastice şi energetice. De asemenea, glicerina în concentraţie de 3-5 % constituie o sursă nutritivă pentru M. tuberculosis şi alte cîteva specii bacteriene, în timp ce pentru majoritatea bacteriilor este bacteriostatică sau chiar bactericidă. De exemplu, formele vegetative de B.anthracis sînt distruse în soluţie glicerinată, dar sporii îşi conservă viabilitatea timp îndelungat. Soluţiile glicerinate nu sînt virulicide (nu omoară virusurile). Sînt apoi substanţe îndeobşte nocive, dar care nu au aceeaşi acţiune faţă de toate bacteriile. De exemplu, SO_4H_2 în concentraţie de 15 % exercită o acţiune bactericidă puternică şi rapidă faţă de toate bacteriile, dar nu faţă de M.tuberculosis şi alte bacterii acido-rezistente.

Substanţele chimice cu acţiune nocivă pentru bacterii au o largă aplicaţie în practică medicală, unele fiind utilizate în lucrările de dezinfecţie, altele în terapia infecţiilor. După caracteristicile de

acţiune şi utilitatea lor, ele sînt grupate în două categorii:

- substanţe chimice cu acţiune nespecifică, în categoria cărora intră dezinfectantele şi antisepticele:

- substanţe chimice cu acţiune specifică, în categoria cărora intră chimioterapicele de sinteză (sulfamidele, sulfonele, derivaţii nitrofuranului etc.) şi antibioticele.

5.2.1. SUBSTANŢE CHIMICE CU ACŢIUNE NESPECIFICĂ. Multe substanţe chimice active în concentraţii foarte mici sînt definite ca avînd o acţiune nespecifică, pentrucă în dozele în care sînt nocive pentru bacterii, sînt, de regulă, nocive şi pentru celule şi ţesuturile animale. In funcţie de caracteristicile de acţiune şi de utilitatea lor, sînt grupate în două categorii: dezinfectante şi antiseptice.

5.2.1.1. Substanţele dezinfectante sînt bactericide în concentraţie foarte mică, dar fiind la fel de nocive şi pentru celulele şi ţesuturile animale pot fi utilizate numai la dezinfecţia locuinţelor, a adăposturilor, a padocurilor şi a terenurilor contaminate, a vehiculelor, a obiectelor, a apei etc. Dintre acestea, cea mai largă utilitate în practica medical veterinară o au: hidroxidul de sodiu, varul cloros, formolul, fenolul, crezolul etc.

5.2.1.2. Substanţele antiseptice sînt de regulă bacteriostatice, uneori bactericide, dar în concentraţiile active pentru bacterii sînt mai puţin nocive faţă de celulele şi ţesuturile animale. De aceea, ele pot fi utilizate la dezinfecţia pielii, a mucoaselor, a plăgilor, a cîmpului operator, iar unele chiar în terapia unor infecţii superficiale. Din categoria acestora fac parte:

alcoolii, tinctura de iod, soluţiile de permanganat de potasiu, peroxidul de hidrogen, rivanolul, detergenţii, unii coloranţi bazici sub formă de soluţii sau pomezi (albastrul de metilen, cristalul violet, pioctanina), unii compuşi ai metalelor grele sub formă de soluţii sau pomezi (de argint, cupru, mercur).

Modul de acţiune al dezinfectantelor şi antisepticelor este diferit de la o substanţă la alta. Efectele nocive depind mai ales de proprietăţile de adsorbţie şi difuziune sau de solubilitatea în constituienţii celulei bacteriene, urmate de producerea unor lezări morfostructurale şi funcţionale incompatibile cu supravieţuirea, cum sînt:

- lezarea funcţiei de semipermeabilitate şi de barieră osmotică a peretelui bacterian şi a membranei citoplasmatice (substanţele tensioactive, detergenţi, săpunurile, fenolul);
- denaturarea unor proteine celulare esenţiale (acizii, alcalii, alcolii etc);
- blocarea unor grupări active ale enzimelor (aminice, amidice, sulfhidrilice, imidazolice etc.) şi interferarea metabolismului energetic (formolul, sărurile metalelor grele, agenţii oxidanţi: Cl, I, Br, H_2O_2 $KMnO_4$ etc.);
- blocarea funcţională a acizilor nucleici (coloranţii bazici) şi dereglarea gravă a activităţii metabolice.

Desigur că unele dezinfectante şi antiseptice pot acţiona asupra celulei bacteriene pe mai multe căi. Cîteva date cu referire la modul lor de acţiune sînt prezentate sintetic în tabelul alăturat.

Tabelul 2

Substanţe dezinfectante şi antiseptice de importanţa majoră

Grupa de substanţe	Mecanisme de acţiune	Substanţele dezinfectante şi antiseptice
1	2	3
Substanţe care acţionează nociv prin denaturarea proteinelor celulare	Denaturează proteinele prin blocarea grupărilor aminice libere(halogenare)	Iodul (sol.Lugol, t-ra de iod, benzina iodată, iodura de sodiu, iodura de potasiu, iodoformul etc.) Clorul şi derivaţii clorului (hipocloritul de Ca, hipocloritul de K, cloraminele)
	Denaturează proteinele prin blocarea grupărilor aminice, iar uneori-concomitent- şi a grupărilor carboxilice (dezinfectanţi reductori)	Formaldehida şi derivaţii acesteia: formolul şi trioximetilenul
	Denaturează puternic componentele de suprafaţă şi proteinele endocelulare (hidrolizare).	Alcalii: hidroxidul de Na, hidroxidul de K, hidroxidul de Ca etc.
	Precipită albuminele şi coagulează straturile periferice ale citoplasmei	Alcoolii: alcoolul etilic (concentraţia optimă 70°)

691

(Continuare Tabelul 2)

1.	2.	3.
Substanţe care acţionează prin dereglarea sistemelor enzimatice	Modifică enzimele cu grupări sulfhidrilice	Mercurul şi sărurile de mercur (sublimatul corosiv, oxidul galben de mercur)
	Modifică enzimele prin acţiunea oxidantă asupra grupărilor aminice, imidazolice, fenolice	Halogenii şi unii compuşi halogenaţi; Perhidrolul; Permanganatul de K.
	Modifică întreaga moleculă enzimatică	Fenolii şi crezolii
Substanţe tensioactive	Produc modificări de suprafaţă ale celulei bacteriene, în special dereglarea funcţiilor de barieră ale membranei citoplasmatice.	Săpunurile medicinale cu antiseptice; Detergenţi cationici; Bromocetul etc.

5.2.2. SUBSTANTE CU ACTIUNE SPECIFICA . Din categoria acestora fac parte numeroase substanţe chimioterapice şi antibiotice, utilizate pe larg în profilaxia sau terapia infecţiilor la om şi animale. Ele sînt definite ca substanţe cu acţiune specifică pentrucă în dozele mici în care sînt active pentru bacterii, sînt practic lipsite de nocivitate pentru celulele şi ţesuturile animale.

5.2.2.1. SUBSTANTELE CHIMIOTERAPICE. Sînt produse de chimiosinteză cu efect bacteriostatic, cele mai multe acţionînd ca "inhibitori competitivi" ai unor metaboliţi esenţiali pentru celula bacteriană. Principalele grupe de chimioterapice sînt: sulfamidele, sulfonele, nitrofuranul şi derivaţii acestuia, acidul paraminosalicilic (PAS) şi hidrazida acidului izonicotinic (HIN).

SULFAMIDELE. Descoperirea rolului antiinfecţios al sulfamidelor a fost făcută de DOMAGK (1935), care a arătat că prontozilul (derivat sulfanilamidic roşu) este foarte activ "in vivo" în terapia unor infecţii, deşi "in vitro" este lipsit de nocivitate faţă de culturile bacteriene[1]. Acest comportament aparent paradoxal a fost elucidat în acelaşi an (TREFOUEL şi colab), stabilindu-se că prontozilul este scindat în organism în cele două molecule sulfanilamidice constitutive şi că acestea sînt cele care au acţiune antibacteriană. S-a deschis astfel calea spre sinteza unor noi derivaţi sulfamidici cu

---

1) Primul derivat sulfamidic sintetizat a fost sulfanilamida (GELMO, 1908). Pe baza acestui compus cu nucleu benzenic s-a sintetizat prontozilul, un derivat sulfamidic roşu, constituit din două nuclee sulfanilamidice (MIETSCH şi KLARER, 1932).

efecte antibacteriene superioare.

Cercetările au luat un avînt considerabil odată cu descoperirea la scurt timp a mecanismului de acţiune a nucleului sulfanilamidic. S-a constatat că <u>acidul para-aminobenzoic (PAB)</u> conţinut de extractul de drojdie de bere exercită o acţiune antagonică faţă de sulfanilamidă, anihilîndu-i efectul (WOOD,1940). Această acţiune antagonică este consecinţa faptului că cele două componente au o structură chimică foarte asemănătoare . Pe de altă parte, acidul PAB reprezintă pentru celula bacteriană un factor esenţial de creştere. El intră în structura <u>acidului folic</u>, component pe care bacteriile îl sintetizează singure şi care îndeplineşte funcţia de coenzimă în sinteza unor acizi aminaţi, a vit. B 12 şi a bazelor purinice şi pirimidinice. Datorită asemănării de structură, molecula sulfanilamidică pătrunsă în celula bacteriană se poate substitui moleculei de PAB, printr-un proces de "mimetism" biologic, ceea ce duce la blocarea căii metabolice de sinteză a acidului folic şi implicit, la oprirea multiplicării bacteriilor (efect bacteriostatic) [1] (fig.31).

Această descoperire a orientat cercetările spre sinteza unor noi sulfamide, în special a sulfamidelor albe (mai puţin toxice pentru organism, decît sulfamidele roşii), precum şi a unor chimioterapice capabile să se substituie altor metaboliţi esenţiali sau să blocheze alte căi metabolice, indispensabile activităţii vitale a bacteriilor.

<u>Sulfamidorezistenţa</u>. La scurt timp după introducerea în practică, s-a constatat că bacteriile pot deveni rezistente la acţiunea sulfamidelor. Natura fenome-

---

1) Pentru celulele animale sulfamida nu este activă întrucît acestea primesc acidul folic necesar odată cu hrana, în timp ce bacteriile şi-l sintetizează singure;

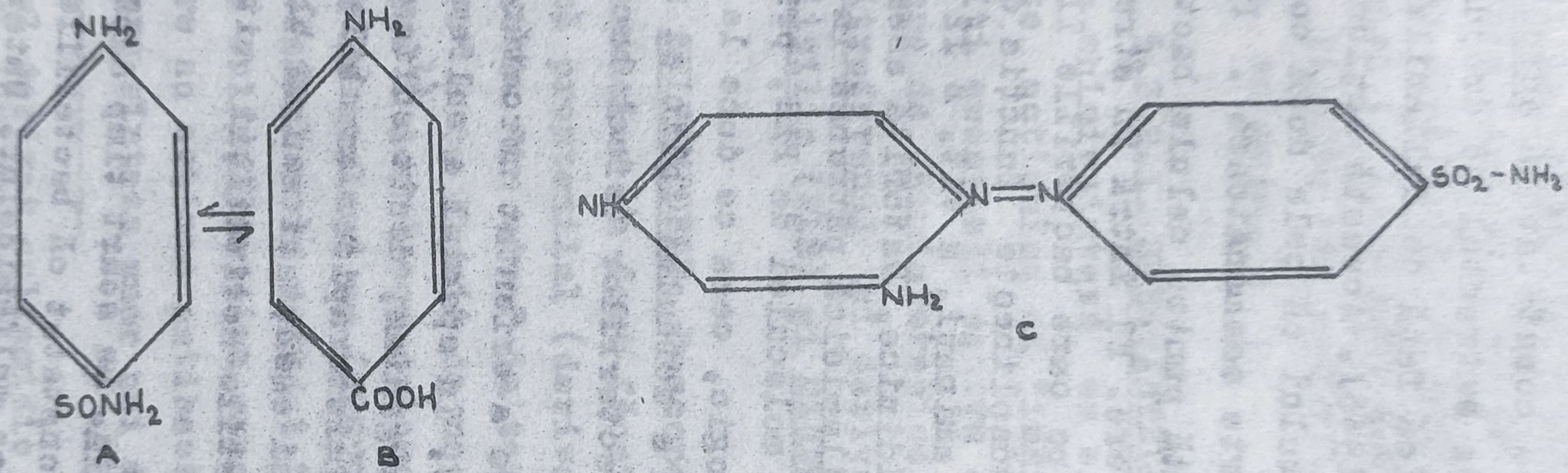


Fig.31.- Structura sulfanilamidei (A), a acidului paraaminobenzoic (B) şi a prontosilului(C)

nului a putut fi, treptat, elucidată. S-a stabilit că în populaţiile bacteriene pot apărea, prin mutaţii spontane, celule rezistente la sulfamidă, care în prezenţa chimioterapicului sînt selectat. Cu alte cuvinte, sulfamida exercită asupra populaţiei o puternică "presiune de selecţie" înlăturînd celulele sensibile, fără să stînjenească însă multiplicarea mutantelor rezistente (din care rezultă astfel variante rezistente la chimioterapic). Mecanismele şi căile prin care bacteriile pot evita acţiunea nocivă a sulfamidelor sînt foarte complexe: în unele cazuri rezistenţa este conferită de proprietatea mutantelor de a sintetiza acid PAB în cantităţi excesive, mai mari decît pot fi substituite de sulfamidă; alte ori rezistenţa este conferită de posibilitatea de a sintetiza metabolitul competiţionat pe alte căi metabolice care nu pot fi blocate de chimioterapic; sulfamidorezistenţa poate fi apoi dată de scăderea permeabilităţii celulei la sulfamidă, de capacitatea acesteia de a "detoxifia" chimioterapicul etc.

Cercetările din ultimul deceniu au relevat că numeroase stări de rezistenţă sînt de natură plasmidică, fiind mediate de factorul "R". Această plasmidă este adesea purtătoare a unor "markeri" de rezistenţă la sulfamide sau la alte chimioterapice. Prin procese de conjugare, plasmide "R" se poate transfera alter celule conferindu-le caracterele de rezistenţă. Şi în aceste cazuri chimioterapicul exercită o "presiune de selecţie" asupra populaţiilor bacteriene, favorizînd selectarea celulelor purtătoare de plasmida "R". Aşa se explică frecvenţa tot mai mare a populaţiilor bacteriene cu rezistenţă la diferite chimioterapice şi la antibiotice, factorul "R" fiind implicat în conferirea stărilor de "rezistenţă multiplă" la chimioterapice şi antibiotice (RMA).

5.2.2.2. ANTIBIOTICELE. Sînt secreţii sau componente de origine biologică cu acţiune antibacteriană sau antifungică. Primul antibiotic obţinut în stare purificată, cristalizată şi injectabilă, a fost penicilina (CHAIN şi colab.1940) extrasă din culturile ciupercii Penicillium notatum. De fapt, încă din 1929, FLEMING a constatat că ciuperca dezvoltată pe culturile de stafilococ produce liza germenilor; la fel, filtratele din culturile ciupercii aveau efect litic.

In perioada 1939 - 1941, DUBOS obţine tirotricina, din culturile de Bacillus brevis, un antibiotic constituit din două componente active: gramicidine şi terocidina.

Pornind de la aceste descoperiri, cercetările pentru găsirea de noi antibiotice au luat un avînt considerabil. S-a putut stabili astfel că asemenea componente sînt elaborate frecvent de numeroase microorganisme, în special de actinomicete aparţinînd genului Streptomyces (streptomicina, Cloramfenicolul, tetraciclina, eritromicina etc.), de bacterii aparţinînd mai ales genului Bacillus (polimixina, bacitracina etc.) şi de diferite ciuperci microscopice din genurile Penicillium (penicilina), cephalosporium (cefalosporina) etc.

Multe componente cu acţiune antibiotică sînt elaborate de plante (usturoiu, hamei, tomate etc.) sau se găsesc în umorile şi ţesuturile animale ca factori naturali de apărare antimicrobiană.

Antibioticele sînt caracterizate printr-un anumit spectru de acţiune antibacteriană sau antimicotică, fiecare antibiotic acţionînd selectiv faţă de un grup mai restrîns sau mai larg de specii. Cele mai multe sînt active faţă de bacterii, majoritatea avînd un efect bacteriostatic şi numai în unele cazuri un efect bactericid. Antibioticele cu acţiune antimicotică, puţine la număr, exercită un efect micostatic, iar în unele cazuri un efect fungicid.

In privinţa mecanismelor de acţiune antibioticele sînt foarte diversificate, fiecare acţionînd într-un mod propriu, la un anumit nivel sau "situs" celular, structural sau funcţional.

Clasificare. Antibioticele pot fi definite şi clasificate din multe puncte de vedere: origine, natură chimică, spectru şi mecanisme de acţiune etc.

După origine, antibioticele aparţin la patru categorii:

- bacterine, elaborate de bacterii;
- micoine, elaborate de ciuperci microscopice;
- fitoncide, conţinute de plante alicina din usturoi şi ceapă, humulonul din hamei, tomatina din tomate etc.);
- zoocide, componente (elaborate de celulele şi ţesuturile organismelor animale şi care acţionează ca factori naturali de apărare antimicrobiană.

După spectrul de acţiune faţă de bacterii, antibioticele pot fi împărţite în:

- antibiotice cu spectru de tip streptomicinic, predominant active faţă de bacteriile Gram-negative (streptomicina, neomicina, kanamicina, gentamicina, polimixina B, colistina etc.

- antibiotice cu spectru larg, active faţă de bacteriile Gram-pozitive, dar şi faţă de bacteriile Gram-negative(tetraciclinele, cloramfenicolul).

După structura şi asemănările chimice, antibioticele se pot constitui în mai multe familii:

- betalactamine (penicilinele şi cefalosporinele);
- macrolide (eritromicina, spiromicina)
- oligozaharide (streptomicina)
- aminoglicozide (neomicina, kanamicina etc.)
- polipeptide ciclice (polimixina B, colistina, colimicina);
- tetracicline ş.a.

Antibioticele pot fi împărţite după mecanismele de acţiune şi "situsul" celular la care acţionează. Din aceste puncte de vedere se disting antibiotice care acţionează la nivelul peretelui bacterian, a membranei citoplasmatice, a genomului celular, a organitelor şi mecanismelor de biosinteză a proteinelor etc.

Mecanisme de acţiune. Diversitatea mare a antibioticelor, cît şi spectrul foarte diferit de acţiune, sugerează că fiecare antibiotic acţionează pe căi şi prin mecanisme proprii, fie ca inhibitor competitiv capabil să blocheze anumite căi metabolice esenţiale, fie prin lezările morfo-structurale sau funcţionale pe care le pot produce la nivelul unor structuri sau organite celulare. Locul şi nivelul ("situs"-ul) la care antibioticele acţionează în celula bacteriană sînt foarte variate, aşa cum rezultă sugestiv din prezentările schematice alăturate.

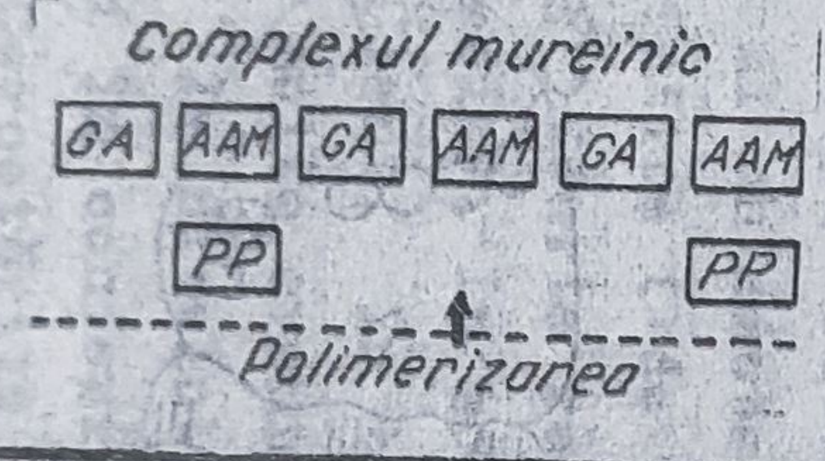
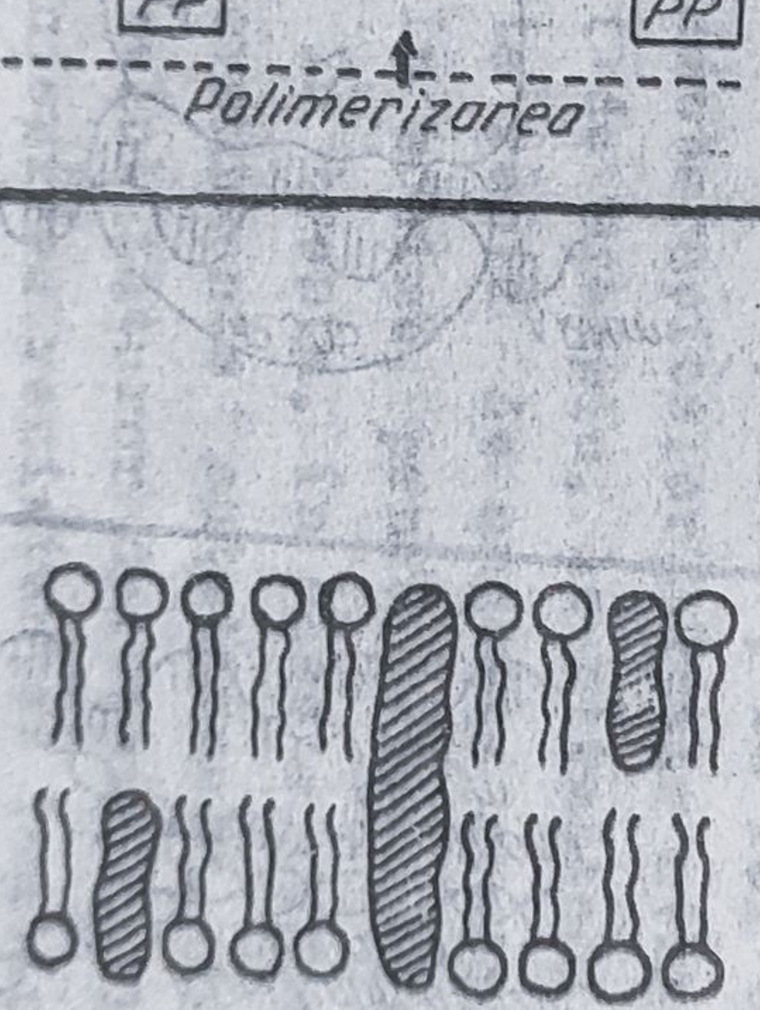
Astfel, unele antibiotice acţionează la nivelul structurilor parietale ale celulei bacteriene, fie prin lezarea structurii peretelui (lysostophina), fie prin interferarea proceselor de sinteză a mureinei (penicilina). Altele acţionează la nivelul membranei citoplasmatice, lezînd mai ales permeabilitatea acesteia şi funcţia de barieră osmotică (polimixina, colistina) etc.

O categorie de antibiotice acţionează la nivelul genomului celular blocînd, de exemplu, duplicarea şi sinteza de ADN (mytomicina, griseofulvina etc.) sau sinteză de ARN (actinomicina D, novobicina) etc.

Multe antibiotice acţionează apoi la nivelul organitelor citoplasmatice, blocînd sau lezînd procesele de biosinteză a proteinelor; unele împiedecă fixarea de ARN_s pe ribozomi (tetraciclina), altele se fixează pe ribozomi perturbînd codificarea proceselor de sinteză a proteinelor (cloramfenicolul), altele lezează

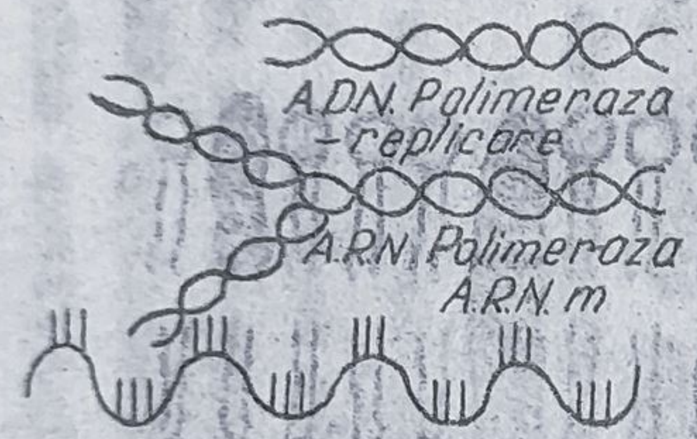
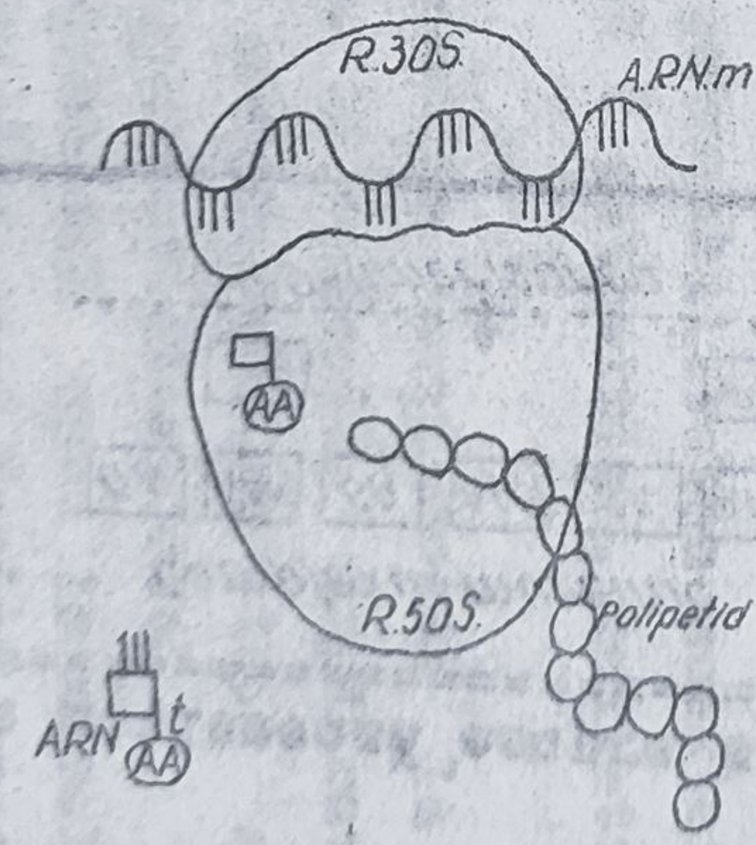
A N T I B I O T I C E

care acţionează asupra structurilor parietale ale celulei bacteriene

Perete bact.		**CICLOSERINA.** Inhibă sinteza dipeptidului terminal din lanţul oligopeptidic (pentapeptidic). **PENICILINA.** Blochează reacţia de transpeptidare şi sinteza oligopeptidului, implicit a mureinei.
Membrana citoplasmatică		**POLIMIXINA, COLISTINA** etc. Se fixează pe grupările anionice ale fosfolipidelor, dezorganizînd ireversibil structura membranei citoplasmatice şi funcţia de barieră osmotică. **AMFOTERICINA, NISTATINA.** Formează cu sterolii complexe stabile, lezînd astfel semipermeabilitatea membranei citoplasmatice. **GRAMICIDINA (A, B, C), ALAMETACINA** etc. Formează cu cationii complexe lipido-solubile, lezînd permeabilitatea membranei citoplasmatice şi transferul acestora prin membrană.

A N T I B I O T I C E

care acţionează asupra genomului şi a organitelor de biosinteză a proteinelor

GENOM		**ACTINOMICINA.** Formează cu guanina un complex stabil, blocînd replicarea ADN. **MITOMICINA.** Se leagă stabil la ADN, formînd punţi intercatenare care fac imposibilă replicarea. **RIFAMPICINA.** Se cuplează stabil cu ARN- polimeraza, blocînd iniţierea transcripţiei genetice **NOVOBIOCINA.** Inhibă sinteza de ADN.
Organite de sînt. proteine		**STREPTOMICINA.** Se combină ireversibil cu o proteină din R.30 S, determinînd poziţionarea şi citirea greşită a codonului aminoacil- ARNt, ceea ce determină sinteza de polipeptid anormal. **CLORAMFENICOLUL.** Se fixează pe R.5o S, interferă funcţiile R şi inhibă polimerizarea aa. **TETRACICLINELE.** Inhibă funcţia R.50 S şi numeroase sisteme enzimatice. **ERITROMICINA, SPIROMICINA, OLEANDOMICINA.** Se fixează pe R.5o S şi inhibă sinteza de proteine.

funcţionalitatea sistemului"ribozom - ARN_m - ARN_s" determinînd sinteza de neoproteine (streptomicina) sau lezează sistemele enzimatice implicate în procesele respiratorii (antimicina A) etc.

Antibiorezistenţa. La scurt timp după introducerea în practică a antibioticelor a fost semnalată apariţia unor variante penicilino-rezistente şi streptomicino- rezistente. Cercetările au precizat că asemenea stări de antibio-rezistenţă pot apărea faţă de oricare antibiotic. Mai mult, în ultima perioadă s-a constatat o creştere îngrijorătoare a frecvenţei populaţiilor bacteriene cu stări de RMA ("rezistenţă multiplă la antibiotice").

Iniţial s-a conturat opinia că stările de rezistenţă sînt procese adaptive, dar faptul că aceste caractere se transmit la descendenţi, în lungul generaţiilor, a impus concluzia că sînt procese de variabilitate genotipică. S-a stabilit, astfel, că, variantele antibiorezistente apar frecvent ca urmare a unor mutaţii naturale, antibioticul acţionînd în selectarea acestora ca un puternic factor "presor", la fel cum se întîmplă şi în cazul chimioterapicelor. Unele stări de rezistenţă la antibiotice (de exemplu, la streptomicină) pot fi cîştigate foarte rapid de anumite specii bacteriene (B.anthracis). In schimb, penicilino-rezistenţa se cîştigă mai lent, în trepte, în aceste cazuri fiind implicate mai multe evenimente mutaţionale, care survin succesiv la nivelul tuturor determinanţilor genetici implicaţi în conferirea rezistenţei (mutaţii multigenice).

Cercetările din ultimul deceniu au relevat, apoi,că numeroase stări de rezistenţă pot fi cîştigate de bacterii pe calea recombinărilor genetice, "markerii" de rezistenţă la antibiotice putînd fi transferaţi de la celulele purtătoare la celulele sensibile prin transducţie, sau transformare, dar mai ales prin conjugare. In acest sens s-a precizat că unele specii bacteriene

sînt frecvent purtătoare de factor "R", o plasmidă care poate conține "markeri" de rezistență la antibiotice și care conferă germenilor caracterele de RMA. Factorul "R" are caracter conductor și poate organiza procese de conjugare intra și interspecifice, în cursul cărora se poate transfera de la celula donatoare (F+) la celula receptoare (F⁻), conferindu-i acesteia caractere de RMA.

Portajul de factor "R" este deosebit de frecvent la bacteriile intestinale, colibacilii fiind în prezent un rezervor imens în natură de factor "R" transferabil prin conjugare la alte specii. Datorită acestui fapt, utilizarea nerațională a antibioticelor în terapie sau ca biostimulatori în hrana animalelor exercită pe plan biologic larg, o "presiune de selecție" asupra populațiilor bacteriene, ceea ce a determinat treptat creșterea considerabilă a frecvenței bacteriilor cu RMA, respectiv purtătoare de plasmidă "R".

Mecanismele prin care bacteriile pot "evita" acțiunea nocivă a antibioticelor sînt, la fel, deosebit de complexe și variate. De exemplu, penicilino-rezistența unor bacterii este conferită de proprietatea de a secreta penicilinază. În alte cazuri, rezistența la antibiotice este consecința schimbării tipului de metabolism, ceea ce permite celulei bacteriene să-și sintetizeze componentele esențiale competiționate de antibiotic pe căi care nu mai pot fi interceptate. Antibiorezistența poate fi conferită apoi de descreșterea permeabilității celulare față de antibiotic, de producerea unor restructurări la nivelul organitelor de biosinteză a proteinelor care le fac insensibile la antibiotic, de sintetizarea în cantități excesive a metabolitului competiționat de antibiotic sau, din contră, de descreșterea cerințelor bacteriei față de metabolitul competiționat etc.

II.

VIRUSOLOGIE GENERALA

II. VIRUSOLOGIE GENERALA

1. INTRODUCERE. Primul virus a fost descoperit de IVANOVSKI, în 1892, în cursul cercetărilor pe care le-a făcut pentru elucidarea etiologiei bolii "mozaicul tutunului". El aduce dovada că sucul extras din frunzele bolnave îşi păstrează proprietăţile infectante şi după trecerea prin filtrele de porţelan, ai căror pori sînt capabili să reţină şi cele mai mici bacterii. Cu asemenea filtrate boala a putut fi reprodusă în serie, de la o plantă la alta, ceea ce i-a permis să tragă concluzia că este produsă de un agent viu, de dimensiuni foarte mici, filtrabil şi invizibil la microscop.

Existenţa virusurilor a atras însă atenţia cercetătorilor după identificarea primei boli virotice la animale. In 1898, LOFFLER şi FROSCH descoperă virusul febrei aftoase. La scurt timp, J.CAROL (1901) şi REED (1902) descoperă primul virus patogen pentru om, virusul febrei galbene. Ulterior sînt identificate numeroase alte virusuri parazite la plante, om şi animale.

Sfera cunoaşterii acestor microorganisme s-a lărgit considerabil prin descoperirea virusurilor parazite la insecte, de către PROWAZEK (1907) şi a virusurilor bacteriofage, de către TWORT (1915) şi d'HERELLE (1917), conturîndu-se astfel cadrul şi problematica unei noi ştiinţe, virusologia.

Perfecţionarea mijloacelor de investigaţie electronoptică a dat un nou avînt în studiul virusurilor, mai ales în direcţia cunoaşterii structurii şi organizării particulelor virale. Apoi, cercetările de genetică microbiană efectuate în ultimele decenii pe bacteriofagi

şi în sistemele virus - celulă au contribuit esenţial la elucidarea multor probleme fundamentale, nu numai de biologie şi patologie virală, ci în general de biologie moleculară. Ca urmare, virusologia a depăşit astăzi graniţele patologiei vegetale şi animale, devenind tratată ştiinţă integrată organic în sfera de mare actualitate şi perspectivă a biologiei moleculare.

2. CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR.

Virusurile se disting fundamental de restul lumii vii. Prin structura şi organizarea lor, ele se situează pe o treaptă evolutivă mai apropiată de materia organică macromoleculară nucleoproteinică lipsită de viaţă, decît de cele mai simple vieţuitoare unicelulare- bacteriile, de care se deosebesc prin numeroase caractere, sînt larg răspîndite în natură. Au o specificitate patogenă strictă de regn, distingîndu-se din acest punct de vedere:

- virusurile fitotrope, parazite la plante;
- virusurile bacteriotrope (bacteriofage), parazite la bacterii;
- virusurile zootrope, parazite la diferite specii de animale.

Deşi sînt foarte mult diversificate, ele au numeroase caracteristici generale definitorii, care le individualizează ca o "categorie" distinctă de "entităţi" infecţioase vii.

2.1. Structura şi organizarea morfo-chimică.

Corpusculul sau particula virală, denumită virion, are o structură şi o organizare subcelulară de tipul unui "agregat" macromolecular nucleoproteinic.

Toate virusurile conţin un singur tip de acid nucleic, de regulă o macromoleculă unică fie de ADN, fie de ARN, în structura căreia se găseşte codificată

întreaga informaţie genetică a virusului şi care constituie genomul viral. In funcţie de natura genomului, virusurile se împart în două categorii: dezoxiribovirusuri (cu genom ADN) şi ribovirusuri (cu genom ARN).

Acidul nucleic viral ocupă zona centrală a virionului. Acesta este înconjurat de un înveliş proteic numit capsidă, alcătuit din subunităţi proteice numite capomere, dispuse în jurul acidului nucleic după o simetrie helicoidală sau cubică. La unele virusuri, capsida este înconjurată şi protejată de un înveliş pericapsidal (gluco-lipo-proteic) denumit şi peplos sau anvelopă.

In raport cu aceste caracteristici structurale virusurile se diferenţiază, la fel, în două categorii:

- virusuril nucleo-proteinice sau "nude", lipsite de pericapsidă;
- virusuri lipo-nucleo-proteinice care posedă înveliş pericapsidal.

La cele mai mari virusuri, încadrate în grupul POX (v.variolice etc.), structura este mai complexă, genomul viral fiind protejat de învelişuri pluristratificate.

2.2. Formă. Virusurile au forme variate dependente de configuraţia acidului nucleic, de simetria de organizare a capsidei şi de complexitatea lor structurală. Se disting cîteva tipuri morfologice:

- forma cilindrică, de bastonaş sau foarte alungită, cu aspect fibrilar sau filamentos, caracteristică virusurilor cu capsidă organizată după o simetrie helicoidală;
- forma izodiametrică, care poate fi icosaedrală, caracteristică virusurilor "nude" cu capsida organizată după o simetrie cubică şi sferoidală la virusurile care posedă pericapsidă;
- forma spermatozoidală caracteristică virusurilor bacteriofage;

- <u>forma de ghiulea</u> (sau glonte), întîlnită numai la virusurile din grupul Rhabdo (v.stomatitei veziculoase, v. rabic etc.)

- <u>forma paralelipipedică</u>, asemănătoare cu o cărămidă, proprie virusurilor din grupul POX (v.variolice etc.)

2.3. <u>Dimensiuni</u>. Virusurile au dimensiuni ce variază între limite de 8 - 10 nm pînă la 300 - 350 nm. Datorită dimensiunilor foarte mici ele sînt <u>invizibile la microscopul fotonic</u>, sînt <u>filtrabile</u> (multe sînt ultrafiltrabile) şi sînt <u>nesedimentabile</u> spontan sau prin centrifugare. Pot fi sedimentate numai prin ultracentrifugare la forţe ce depăşesc 10.000 turaţii/minut.

2.4. <u>Virusurile sînt parazite obligate endocelular</u>. Ele îşi pot manifesta caracteristicile vitale numai în celulele receptive pe care le parazitează. In mediul extracelular virusurile se comportă ca nişte "entităţi" corpusculare inerte.

Parazitismul obligat endocelular este consecinţa faptului că virusurile sînt <u>lipsite de sisteme enzimatice cu rol metabolic</u>. Unele virusuri pot conţine cîteva enzime, dar care au de regulă rol în agresiunea vitală.

2.5. <u>Multiplicare</u>. Virusurile se multiplică numai în celulele parazitate, prin procese şi mecanisme neîntîlnite la alte vieţuitoare. Acidul <u>nucleic viral</u>, eliberat din virion, acţionează în celula gazdă ca un <u>material genetic autonom</u>, independent de genomul celular, programînd sinteza unor enzime sau subordonîndu-şi în celulă sistemele enzimatice necesare pentru sinteza componentelor virale. Din acestea, prin asamblare, rezultă noi virioni maturi. Cu alte cuvinte, virusurile sînt multiplicate de celula infectată, din materia celulară proprie, procesele fiind însă dirijate şi controlate de

genomul viral, conform cu informaţia genetică deţinută în structura sa.

2.6. Forme biologice de existenţă. Virusurile pot exista sub trei forme biologice:

- virus (virion) complet sau matur, cu structură corpusculară completă, caracteristică. Este o formă de existenţă extracelulară, cu proprietăţi de infecţiozitate, care se poate menţine viabilă în natură o perioadă limitată de timp, mai mult sau mai puţin îndelungată, în funcţie de rezistenţa sa la factorii fizico-chimici din mediu;

- virus vegetativ, formă tranzitorie de existenţă endocelulară, infecţioasă, caracteristică pentru etapa în care virusul se multiplică în celulă. In această etapă virusul este lipsit de o structură proprie sisă, găsindu-se sub formă de componente dispersate în celulă, inseparabile de conţinutul acesteia;

- virus integrat sau provirus, formă de existenţă endocelulară , neinfecţioasă, sub care virusul se poate menţine "mascat" în celulă o perioadă nedefinită, în stare de acid nucleic viral integrat în genomul celular, respectiv ca "provirus". Pe toată durata cît se menţine integrat acidul nucleic viral se comportă ca un fragment de material genetic propriu celulei, putînd-i conferi acesteia anumite proprietăţi noi. O asemenea formă de existenţă se întîlneşte în special la bacteriofagi şi la virusurile tumorale (oncogene).

3. ELEMENTE DE MORFOLOGIE VIRALĂ

Dimensiunile foarte mici ale virusurilor, precum şi dificultatea de a le obţine sub o formă suficient de concentrată şi purificată, au constituit impedimente obiective în studiul morfologiei virale.

Virusurile sînt parazite obligat endocelulare şi, de aceea, virionii în stare liberă pot fi obţinuţi numai prin triturarea foarte fină a celulelor şi ţesuturile infectate. Un asemenea "suc" celular este însă foarte sărac în materie virală, în special în cazul triturate-lor din ţesuturile animale. Pe de altă parte, particulele virale se găsesc dispersate într-o masă de materie organică macromoleculară de natură celulară, ceea ce creează mari dificultăţi în separarea, concentrarea şi purificarea lor.

Se pot obţine cantităţi ceva mai mari de materie virală din unele ţesuturi vegetale. De exemplu, din 1 kg de frunze de tutun infectate cu virusul mozaicului (VMT) se pot obţine pînă la 2 gr de materie virală, cu un grad mare de puritate. De aceea multe cercetări fundamentale de virusologie au fost efectuate pe VMT.

Studiul morfologiei virale a necesitat, totodată, punerea la punct şi perfecţionarea continuă a unor me-tode şi mijloace adecvate de investigaţie, cum sînt: <u>filtrarea</u> şi <u>ultrafiltrarea</u>, <u>ultracentrifugarea</u>, <u>microscopia electronică</u> şi altele. Ca urmare, cele mai multe cunoştinţe de morfologie virală sînt de dată relativ recentă, din ultimele 3-4 decenii.

3.1. DIMENSIUNILE VIRUSURILOR.

Pentru determinarea dimensiunii virusurilor au fost uti-lizate diferite metode de cercetare, cum sînt: <u>filtrarea</u>, <u>ultrafiltrarea</u>, <u>ultracentrifugarea</u> şi <u>microscopia</u>

electronică. Dintre acestea cea mai largă utilitate a avut-o, timp îndelungat, ultrafiltrarea prin membrane de colodiu cu porozităţi de dimensiuni cunoscute. Traversarea virusurilor prin porozităţile acestora a permis evaluarea relativă a dimensiunii particulaleler virale. Date mult mai fidele au putut fi obţinute prin microscopia electronică, prin măsurarea imaginii virusurilor obţinute pe ecrane fluorescente sau pe plăci fotografice.

S-a stabilit astfel că virusurile au dimensiuni cuprinse între 8 - 1o nm şi 3oo - 35o nm. Cele mai mici virusuri sînt încadrate în grupele Picorna şi Parvo şi au dimensiuni care se apropie de cele ale macromoleculelor organice. De exemplu, virusul febrei aftoase are dimensiuni între 1o - 24 nm, iar virusul poliomelitei în jur de 3o nm. Cele mai mari virusuri sînt încadrate în grupul Pox şi au dimensiuni pînă la 3oo - 35o nm. Din rîndul lor fac parte virusurile variolice. Ca mărime, acestea se situează la limita vizibilităţii cu microscopul optic, fiind apropiate de dimensiunile celor mai mici bacterii (micoplasmele).

Virusurile de formă cilindrică, fibrilară, au o grosime ce nu depăşeşte cîţiva zeci de nm; lungimea unora poate ajunge însă pînă la 1.ooo nm sau chiar mai mult (în special la unele virusuri fitotrope). O lungime considerabilă au şi virusurile zootrope care se pot prezenta sub formă fibrilară (v.gripal, v.paragripal, v.pestei aviare, v. pseudopestei aviare etc.).

In raport de dimensiuni, virusurile se împart arbitrar în trei categorii: virusuri de dimensiuni mari (15o - 35o nm), medii şi mici (1o - 15 nm). O asemenea împărţire este însă relativă mai ales în cazul virusurilor situate la limitele dintre grupe, întrucît dimensiunile aceluiaş virus pot fi diferite în funcţie de condiţiile de cultivare şi de stadiul de evoluţie şi de maturare intracelulară a virionilor.

3.2. FORMA VIRUSURILOR. Cunoştinţele privind forma virusurilor sînt de dată relativ recentă, ca rezultat al perfecţionării mijloacelor şi metodelor de investigaţie electrono-optică. Microscoapele electronice moderne, cu o mare putere de rezoluţie, permit evidenţierea nu numai a formei virusurilor, ci şi a detaliilor esenţiale de ultrastructură şi arhitectonică. S-a precizat, astfel, că forma virusurilor este în concordanţă cu caracteristicile structurale ale virionilor, fiind determinată în special de configuraţia acidului nucleic, de simetria de organizare a capsidei şi de complexitatea structurală a virionilor.

Virusurile sînt relativ heteromorfe. Deşi diversificate ca formă, ele se pot totuşi încadre în cîteva tipuri morfologice (fig.32)

- Virusuri de formă cilindrică alungită, unele mai scurte asemănătoare cu un bastonaş, altele mai lungi cu aspect fibrilar sau filamentos. Asemenea forme sînt întîlnite la ribovirusuri, fiind determinate de faptul că macromolecula de ARN are o configuraţie liniară, iar în jurul ei se organizează un înveliş capsidal după o simetrie helicoidală;

- Virusuri de formă icosaedrică (poliedrică). Forma acestora este conferită de faptul că macromolecula de acid nucleic se găseşte pliată ca un ghem, iar capsida se organizează în jurul acesteia după o simetrie cubică;

- Virusuri de formă sferoidală. Forma este caracteristică virusurilor care posedă înveliş pericapsidal (peplos);

- Virusuri de formă spermatozoidală. Este o formă caracteristică bacteriofagilor, în structura cărora se distinge o formaţiune mai voluminoasă, cu aspect hexagonal sau sferoidal, denumită "capul" bacteriofagului, la care se ataşează o formaţiune tubulară numită "apendice caudal".

- Virusuri de formă unui "glonte" sau "ghiuleş"

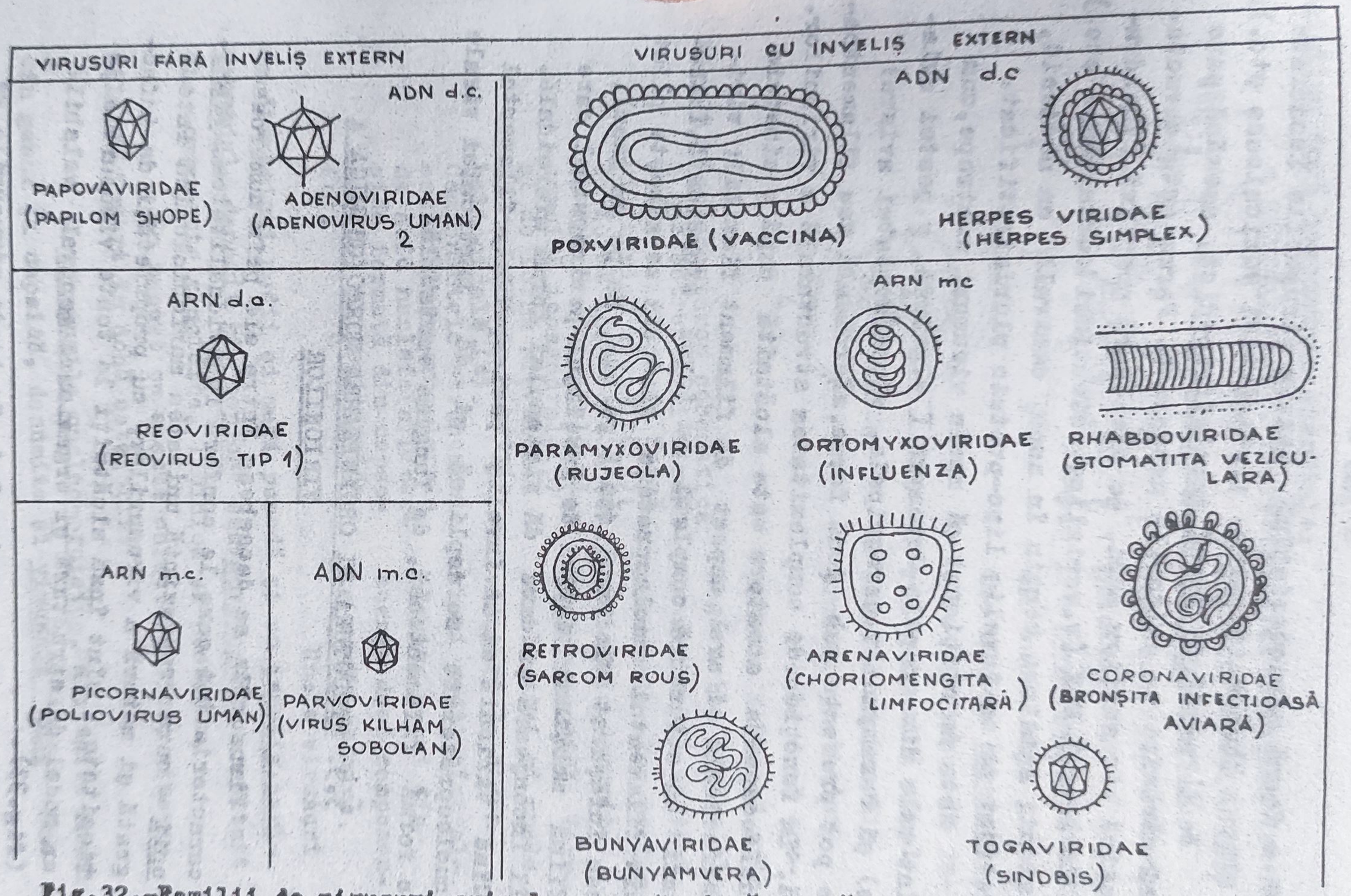


Fig.32.-Familii de virusuri animale grupate după formă, complexitate structurală și tip de acid nucleic.

Este o formă caracteristică pentru virusurile incadrate în grupul Rhabdo (v.rabic, v.stomatitei veziculoase etc.);

- Virusuri de formă paralelipipedică, asemănătoare unei cărămizi cu colţurile rotunjite. Forma este caracteristică virusurilor mari, cu structură complexă, incadrate în grupul POX (v.variolice, v.ectimei contagioase etc.), Virionii acestora conţin în zona centrală un nucleoid, protejat de un înveliş lipo-proteic pluristratificat.

Este de menţionat că unele virusuri zootrope,cum sînt cele din grupele Ortomyxo (v.gripal, v.pestei aviare) şi Paramyxo (v.paragripale, v.pseudopestei aviare) se pot prezenta sub două forme,sferoidală sau filamentoasă, în funcţie de complexitatea structurală a virionilor. Nucleocapsida acestora este alcătuită după o simetrie helicoidală şi are aspect de filament flexibil; virionii cu structură completă au forma sferoidală,întrucît filamentul nucleoproteic flexibil se găseşte pliat sau înfăşurat în jurul său (ca aţa de pe un ghem), fiind menţinut astfel de învelişul pericapsidal care îl înconjoară şi care dă virionului formă sferoidală. Cînd virionii nu au înveliş pericapsidal, filamentul nucleoproteinic se depliază şi dă particulei virale o formă filamentoasă, de lungime variabilă.

3.3. STRUCTURA SI ORGANIZAREA MORFO-CHIMICA A VIRIONILOR

Virusurile se deosebesc între ele prin numeroase caracteristici care le conferă individualitatea. Virionii - care reprezintă unitatea marfobiologică integrată şi matură a virusurilor, cu proprietăţi de infecţiozitate, sînt însă alcătuiţi la toate virusurile pe un model de structură şi organizare general valabilă (fig.33).

In structura virionului, la toate virusurile,se

disting două componente esenţiale:

- <u>genomul viral</u>, reprezentat de o macromoleculă de acid nucleic, <u>ADN</u> sau <u>ARN</u>, care ocupă zona centrală a virionului;

- <u>capsida</u>, alcătuită din subunităţi proteice numite <u>capsomere</u>, care se dispun în jurul genomului viral formînd un înveliş proteic protector.

Aceste două componente formează, prin legăturile dintre ele, un veritabil agregat macromolecular nucleoproteinic, denumit <u>nucleo-capsidă</u>. Virusurile mici şi unele virusuri de dimensiuni medii sînt alcătuite numai din aceste două componente morfo-chimice.

Unele virusuri de dimensiuni medii şi mari posedă şi un <u>înveliş pericapsidal</u>, denumit şi "<u>peplos</u>" sau "<u>anvelopă</u>", constituit din componente glucidice, lipidice şi proteice.

In raport cu aceste caracteristice, virusurile se împart în două categorii:

- <u>virusurile nucleo-proteice</u>, alcătuite numai din genom şi capsidă, denumite şi <u>virusuri "nude"</u> sau

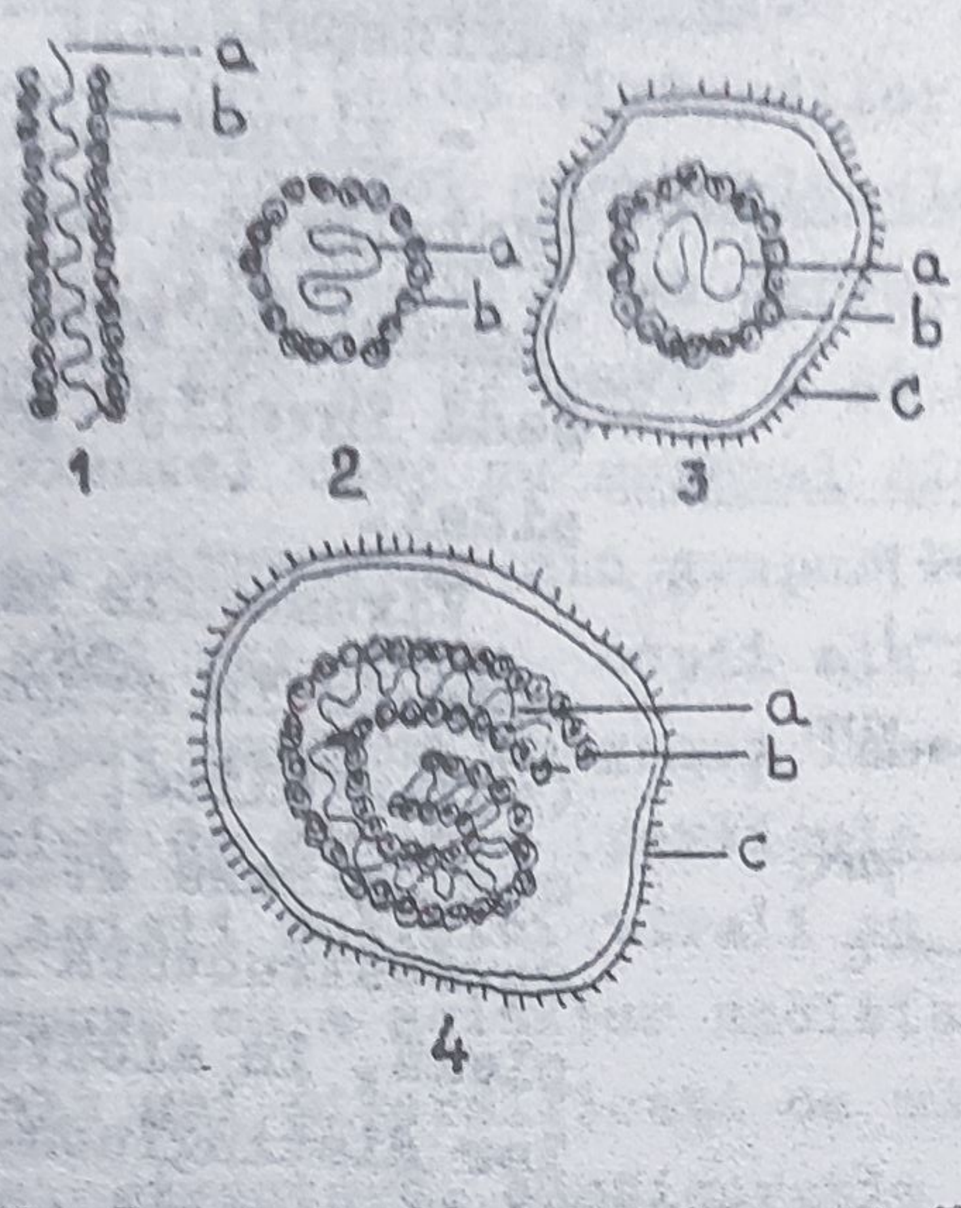
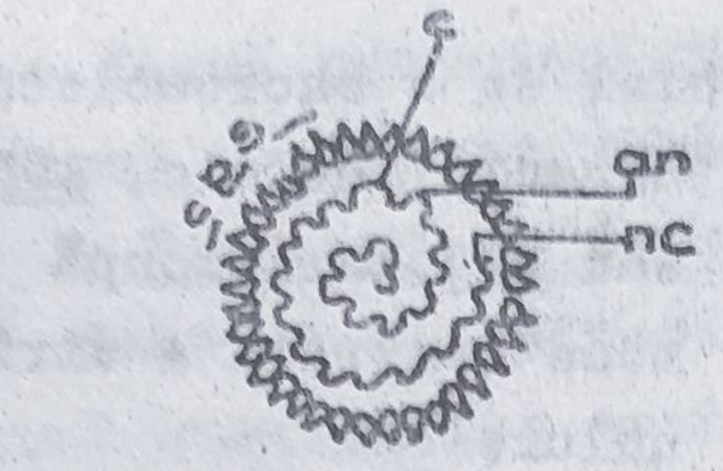
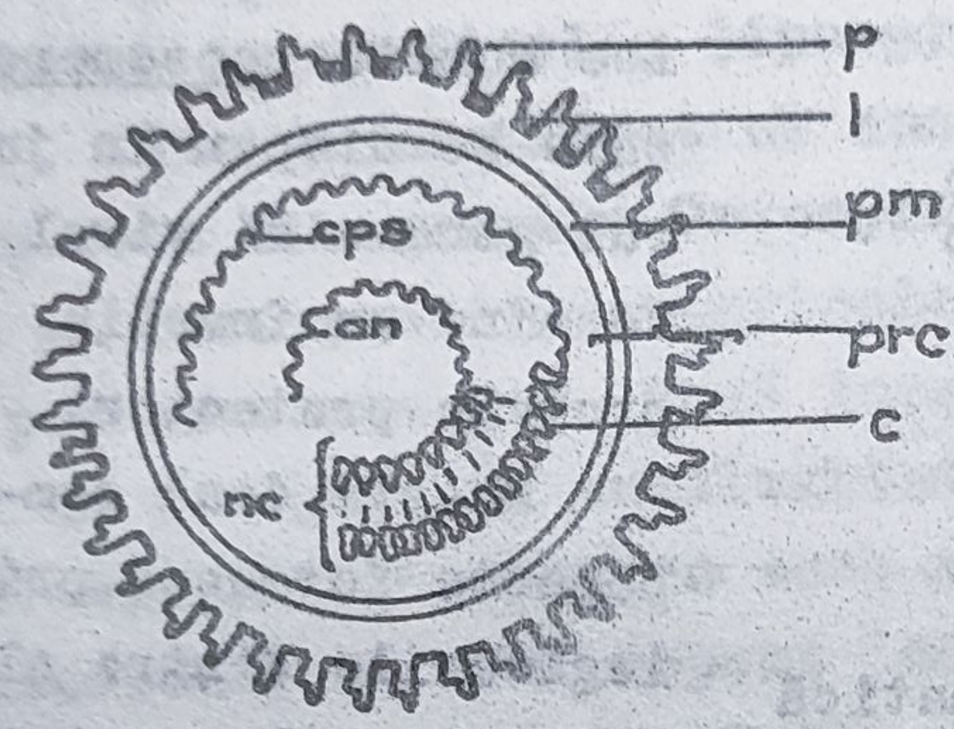


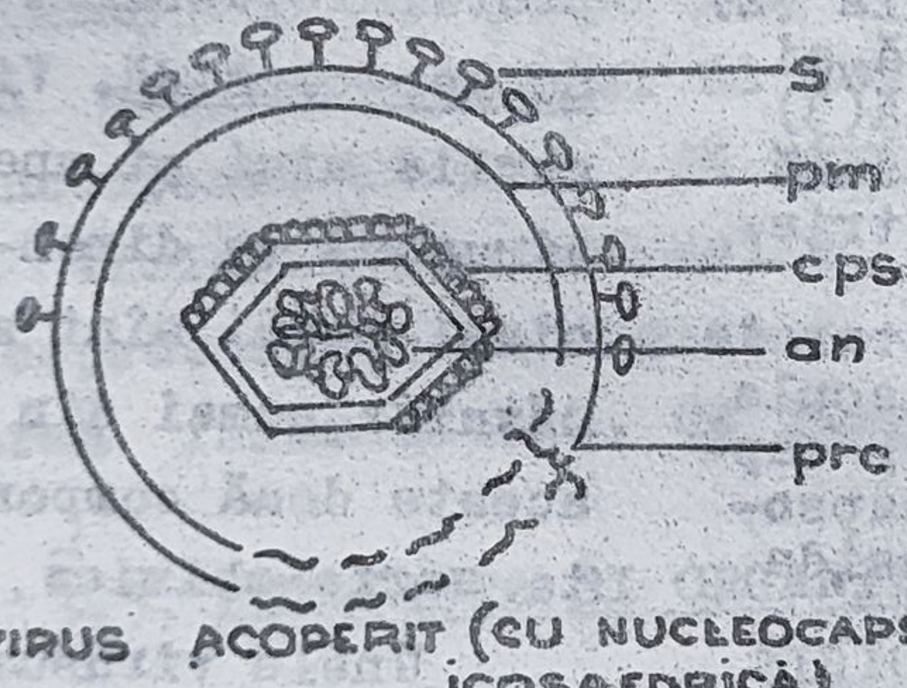
Fig.33.-Reprezentarea schematică a morfostructurii virusurilor: virioni de formă cilindrică alungită(1); de formă icosaedrală (2) de formă sferoidală şi capsidă icosaedrală(3) şi de formă sferoidală cu capsidă cu simetrie helicoidală (4). Componentele structurale esenţiale: macromolecula de acid nucleic(a); capsida formată din capsomere(b) şi pericapsida (c).



VIRUS NUD
(FĂRĂ PERICAPSIDĂ)



VIRUS ACOPERIT (CU
NUCLEOCAPSIDA HELICOIDALĂ)



VIRUS ACOPERIT (CU NUCLEOCAPSIDĂ
ICOSAEDRICĂ)

Fig.34.-Reprezentare schematică a structurii virusurilor şi a componentelor structurale: acid nucleic (an), capsomere(c), capsidă(cps), nucleocapsidă (nc), pericapsidă(prc), peplomere (p), lipide(l),proteine de membrană (pm), spicule(s).

"<u>Nacoperite</u>" (pentruca sînt lipsite de învelig pericapsidal);

- <u>virusurile lipo-proteinice</u>, denudate şi "<u>acoperite</u>"pentrucă posedă învelig pericapsidal.

Virusurile mari,încadrate în grupul POX (v.variolice, v.ectimei contagioase etc.) au o morfostructură mai complexă, în alcătuirea lor distingîndu-se un "nucleoid" bine definit, care ocupă zona centrală a virionului, protejat de un învelig cu o structură mai complexă, pluristratificată.

3.3.1. <u>GENOMUL VIRAL.</u>

Spre deosebire de alte vieţuitoare, virusurile conţin un singur tip de <u>acid nucleic</u>, <u>ADN</u> sau <u>ARN</u>, ceea ce permite împărţirea lor în două categorii: <u>dezoxiribovirusuri</u> (virusuri cu genom ADN) şi <u>ribovirusuri</u> (virusuri cu genom ARN).

Acidul nucleic deţine în structura sa întreaga informaţie genetică a virusului şi, ca urmare, reprezintă cromozomul sau genomul viral.

La majoritatea virusurilor, acidul nucleic se găseşte sub forma unei macromolecule unice, situată în zona centrală a virionului. Fac excepţie virusurile zootrope din grupele REO şi Ortomyxo (şi unele virusuri parazite pentru plante) care au genomul divizat în mai multe segmente. La virusurile din grupul Paramyxo, în unii virioni se pot găsi mai multe copii ale genomului viral; alţi virioni pot conţine un genom incomplet sau pot fi lipsiţi chiar de genom (particule virale "goale").

Acizii nucleici virali au caracteristici fundamentale comune cu a acizilor nucleici de altă origine, dar sînt mult mai diversificaţi ca mărime, compoziţie în baze azotate, structură, configuraţie spaţială, topologie etc. In general, în structura lor intră aceleaşi tipuri de nucleotide, cu excepţia unor fagi anticolibacilari la care citozina este substituită cu 5- hidroximetil-citozină sau alţi derivaţi care nu se găsesc în acizii nucleici de altă origine.

Compoziţia în baze a genomului viral (G+C %) variază în limite largi, fiind cuprinsă la virusurile zootrope între 35 - 74 %. Proporţia G + C are de regulă o semnificaţie taxonomică, deşi în unele cazuri în cadrul aceluiaşi grup pot exista variaţii mari (la Herpesvirus între 46%- 74 %).

Virusurile cu potenţial oncogen au coeficient G + C mai apropiat de cel al ADN-ului din celulele de mamifere (G + C = 4o %). De exemplu, la Adenovirusuri coeficientul este de 48 % la tulpinile foarte oncogene, de 52 % la cele slab oncogene şi de 58 % la tulpinile neoncogene.

Mărimea şi greutatea genomului viral diferă în

limite largi de la un virus la altul. Cantitatea genomul viral reprezintă între 3 - 3o % din masa totală a virionilor. La virusurile foarte mici (Parvoviridae) greutatea moleculară a genomului este de $1,2 - 1,8 .10^6$ dal; la Poxviridae genomul are cea mai mare greutate moleculară, de cca $2oo . 10^6$ dal.

Conţinutul în informaţie genetică este în concordanţă directă cu mărimea genomului viral, numărul genelor variind de la un virus la altul, între 3 gene (la Poliomavirus) şi 16o gene (la Poxvirusuri).

<u>Configuraţia spaţială</u> a macromoleculei de acid nucleic este la cele mai multe virusuri <u>liniară</u>. La unele virusuri genomul poate avea însă o configuraţie <u>circulară</u> (v.encefalomiocarditei şoarecelui). El poate prezenta un anumit număr de răsuciri superhelicoale suplimentare (fig.35), dînd macromoleculei un aspect circular suprarăsucit (Papovaviridae). La unele virusuri circularizarea genomului se produce numai în anumite faze din ciclul de viaţă; de exemplu, înainte de pătrunderea virionilor în celulă. Circularizarea în această fază este probabil o condiţie prealabilă pentru integrarea în genomul celulei gazdă(Herpesviridae, Adenoviridae).

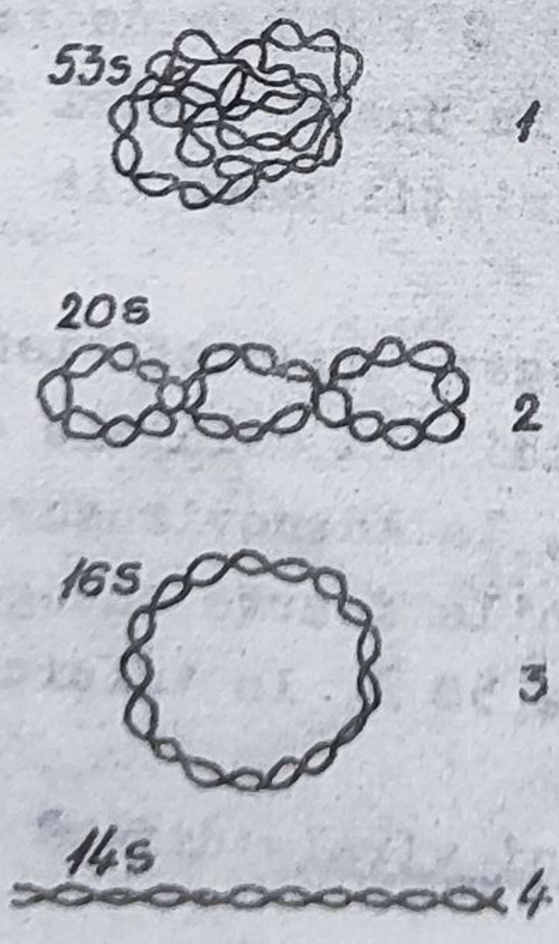


Fig.35.- Tipuri de configuraţie a acidului nucleic la v.poliom (în funcţie de viteza de centrifugare): cicliă superrăsucită (1 şi 2), cicliă circulară (3) şi liniară (4).

electronică. Dintre acestea cea mai largă utilitate a avut-o, timp îndelungat, ultrafiltrarea prin membrane de colodiu cu porozităţi de dimensiuni cunoscute. Traversarea virusurilor prin porozităţile acestora a permis evaluarea relativă a dimensiunii particulalelor virale. Date mult mai fidele au putut fi obţinute prin microscopia electronică, prin măsurarea imaginii virusurilor obţinute pe ecrane fluorescente sau pe plăci fotografice.

S-a stabilit astfel că virusurile au dimensiuni cuprinse între 8 - 1o nm şi 3oo - 35o nm. Cele mai mici virusuri sînt încadrate în grupele Picorna şi Parvo şi au dimensiuni care se apropie de cele ale macromoleculelor organice. De exemplu, virusul febrei aftoase are dimensiuni între 1o - 24 nm, iar virusul poliomelitei în jur de 3o nm. Cele mai mari virusuri sînt încadrate în grupul Pox şi au dimensiunni pînă la 3oo - 35o nm. Din rîndul lor fac parte virusurile variolice. Ca mărime, acestea se situează la limita vizibilităţii cu microscopul optic, fiind apropiate de dimensiunile celor mai mici bacterii (micoplasmale).

Virusurile de formă cilindrică, fibrilară, au o grosime ce nu depăşeşte cîţiva zeci de nm; lungimea unora poate ajunge însă pînă la 1.ooo nm sau chiar mai mult (în special la unele virusuri fitotrope). O lungime considerabilă au şi virusurile zootrope care se pot prezenta sub formă fibrilară (v.gripal, v.paragripal, v.pestei aviare, v. pseudopestei aviare etc.).

In raport de dimensiuni, virusurile se împart arbitrar în trei categorii: virusuri de dimensiuni mari (15o - 35o nm), medii şi mici (1o - 15 nm). O asemenea împărţire este însă relativă mai ales în cazul virusurilor situate la limitele dintre grupe, întrucît dimensiunile aceluiaş virus pot fi diferite în funcţie de condiţiile de cultivare şi de stadiul de evoluţie şi de maturare intracelulară a virionilor.

3.2. FORMA VIRUSURILOR. Cunoştinţele privind forma virusurilor sînt de dată relativ recentă, ca rezultat al perfecţionării mijloacelor şi metodelor de investigaţie electrono-optică. Microscoapele electronice moderne, cu o mare putere de rezoluţie, permit evidenţierea nu numai a formei virusurilor, ci şi a detaliilor esenţiale de ultrastructură şi arhitectonică. S-a precizat, astfel, că forma virusurilor este în concordanţă cu caracteristicile structurale ale virionilor, fiind determinată în special de configuraţia acidului nucleic, de simetria de organizare a capsidei şi de complexitatea structurală a virionilor.

Virusurile sînt relativ heteromorfe. Deşi diversificate ca formă, ele se pot totuşi încadra în cîteva tipuri morfologice (fig.32)

- Virusuri de formă cilindrică alungită, unele mai scurte asemănătoare cu un bastonaş, altele mai lungi cu aspect fibrilar sau filamentos. Asemenea forme sînt întîlnite la ribovirusuri, fiind determinate de faptul că macromolecula de ARN are o configuraţie liniară, iar în jurul ei se organizează un înveliş capsidal după o simetrie helicoidală;

- Virusuri de formă icosaedrică (poliedrică). Forma acestora este conferită de faptul că macromolecula de acid nucleic se găseşte plisată ca un ghem, iar capsida se organizează în jurul acesteia după o simetrie cubică;

- Virusuri de formă sferoidală. Forma este caracteristică virusurilor care posedă înveliş pericapsidal (peplos);

- Virusuri de formă spermatozoidală. Este o formă caracteristică bacteriofagilor, în structura cărora se distinge o formaţiune mai voluminoasă, cu aspect hexagonal sau sferoidal, denumită "capul" bacteriofagului, la care se ataşează o formaţiune tubulară numită "apendice caudal".

- Virusuri de formă unui "ciorchine" sau "ghiulea"

Fig.32.-Familii de virusuri animale grupate după formă, complexitate structurală și tip de acid nucleic.

Este o formă caracteristică pentru virusurile încadrate în grupul Rhabdo (v.rabic, v.stomatitei veziculoase etc.);

- Virusuri de formă paralelipipedică, asemănătoare unei cărămizi cu colţurile rotunjite. Forma este caracteristică virusurilor mari, cu structură complexă, încadrate în grupul POX (v.variolic, v.ectimei contagioase etc.). Virionii acestora conţin în zona centrală un nucleoid, protejat de un înveliş lipo-proteic pluristratificat.

Este de menţionat că unele virusuri zootrope, cum sînt cele din grupele Ortomyxo (v.gripal, v.pestei aviare) şi Paramyxo (v.paragripale, v.pseudopestei aviare) se pot prezenta sub două forme, sferoidală sau filamentoasă, în funcţie de complexitatea structurală a virionilor. Nucleocapsida acestora este alcătuită după o simetrie helicoidală şi are aspect de filament flexibil; virionii cu structură completă au forma sferoidală, întrucît filamentul nucleoproteic, flexibil se găseşte pliat sau înfăşurat în jurul său (ca aţa de pe un ghem), fiind menţinut astfel de învelişul pericapsidal care îl înconjoară şi care dă virionului formă sferoidală. Cînd virionii nu au înveliş pericapsidal, filamentul nucleoproteinic se depliază şi dă particulei virale o formă filamentoasă, de lungime variabilă.

3.3. STRUCTURA SI ORGANIZAREA MORFO-CHIMICA A VIRIONILOR

Virusurile se deosebesc între ele prin numeroase caracteristici care le conferă individualitatea. Virionii - care reprezintă unitatea morfobiologică integrată şi matură a virusurilor, cu proprietăţi de infecţiozitate, sînt însă alcătuiţi la toate virusurile pe un model de structură şi organizare general valabilă (fig.33).

In structura virionului, la toate virusurile, se

disting două componente esenţiale:

- <u>genomul viral</u>, reprezentat de o macromoleculă de acid nucleic, <u>ADN</u> sau <u>ARN</u>, care ocupă zona centrală a virionului;

- <u>capsida</u>, alcătuită din subunităţi proteice numite <u>capsomere</u>, care se dispun în jurul genomului viral formînd un înveliş proteic protector.

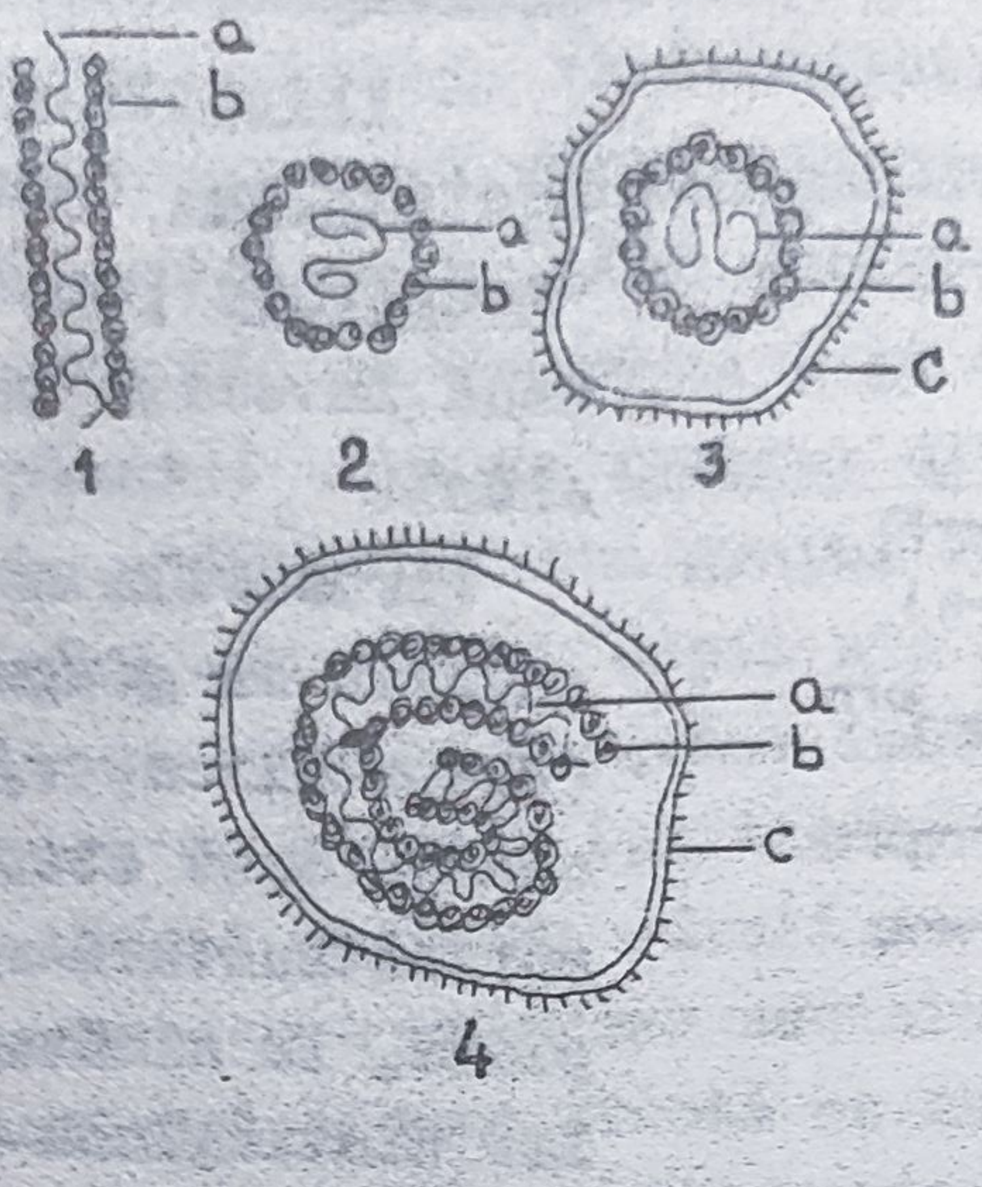


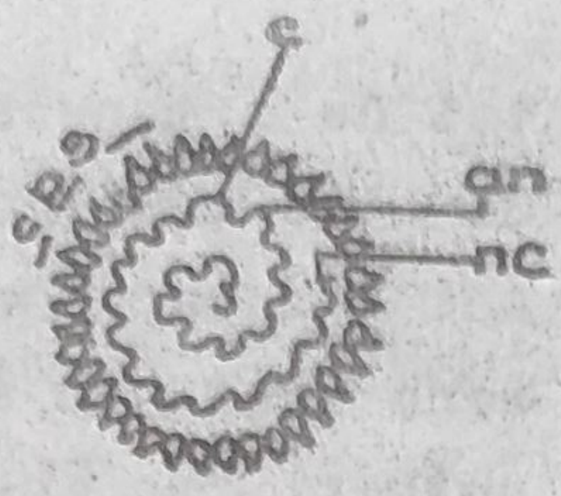
Fig.33.-Reprezentarea schematică a morfostructurii virusurilor: virioni de formă cilindrică alungită(1); de formă icosaedrală (2) de formă sferoidală şi capsidă icosaedrală(3) şi de formă sferoidală cu capsidă cu simetrie helicoidală (4). Componentele structurale esenţiale:macromolecula de acid nucleic(a); capsida formată din capsomere(b) şi pericapsida (c).

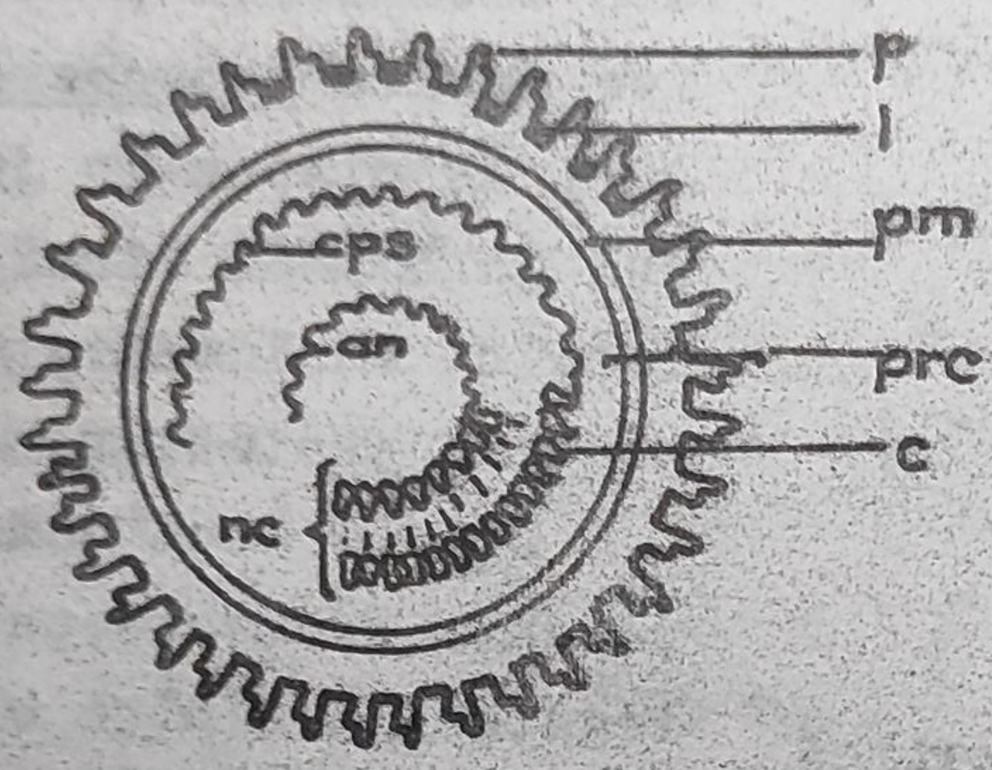
Aceste două componente formează,prin legăturile dintre ele, un veritabil agregat macromolecular nucleoproteinic,denumit <u>nucleo-capsidă</u>. Virusurile mici şi unele virusuri de dimensiuni medii sînt alcătuite numai din aceste două componente morfo-chimice.

Unele virusuri de dimensiuni medii şi mari posedă şi un <u>înveliş pericapsidal</u>, denumit şi "<u>peplos</u>" sau"<u>anvelopă</u>", constituit din componente glucidice, lipidice şi proteice.

In raport cu aceste caracteristice, virusurile se împart în două categorii:

- <u>virusurile nucleo-proteice</u>, alcătuite numai din genom şi capsidă, denumite şi <u>virusuri "nude"</u> sau





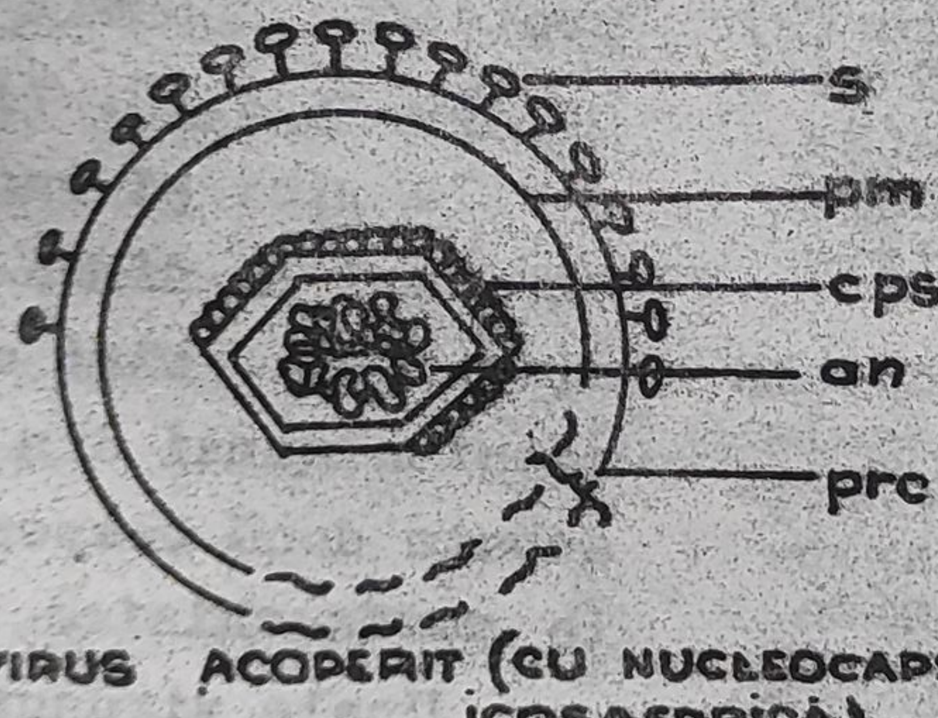


Fig.34.-Reprezentare schematică a structurii virusurilor şi a componentelor structurale: acid nucleic (an), capsomere(c), capsidă(cps), nucleocapsidă (nc), pericapsidă(prc), peplomere (p), lipide(l),proteine de membrană (pm), spicule(s).

"descoperite" (pentrucă sînt lipsite de învelig periocapsidal);

- virusurile lipoproteinice, denumite şi "acoperite"pentrucă posedă învelig pericapsidal.

Virusurile mari,încadrate în grupul POX (v.variolice, v.actinei contagioase etc.) au o morfostructură mai complexă, în alcătuirea lor distingîndu-se un "nucleoid" bine definit, care ocupă zona centrală a virionului, protejat de un înveliş cu o structură mai complexă, pluristratificată.

3.3.1. GENOMUL VIRAL.

Spre deosebire de alte vieţuitoare, virusurile conţin un singur tip de acid nucleic, ADN sau ARN, ceea ce permite împărţirea lor în două categorii: dezoxiribovirusuri (virusuri cu genom ADN) şi ribovirusuri (virusuri cu genom ARN).

Acidul nucleic deţine în structura sa întreaga informaţie genetică a virusului şi, ca urmare, reprezintă <u>cromozomul</u> sau <u>genomul viral</u>.

La majoritatea virusurilor, acidul nucleic se găseşte sub forma unei <u>macromolecule unice</u>, situată în zona centrală a virionului. Fac excepţie virusurile zootrope din grupele REO şi Ortomyxo (şi unele virusuri parazite pentru plante) care au <u>genomul divizat</u> în mai multe segmente. La virusurile din grupul Paramyxo, în unii virioni se pot găsi mai multe copii ale genomului viral; alţi virioni pot conţine un genom incomplet sau pot fi lipsiţi chiar de genom (particule virale "goale").

Acizii nucleici virali au caracteristici fundamentale comune cu a acizilor nucleici de altă origine, dar sînt mult mai diversificaţi ca mărime, compoziţie în baze azotate, structură, configuraţie spaţială, topologie etc. In general, în structura lor intră aceleaşi tipuri de nucleotide, cu excepţia unor fagi anticolibacilari la care citozina este substituită cu 5- hidroximetil-citozină sau alţi derivaţi care nu se găsesc în acizii nucleici de altă origine.

<u>Compoziţia în baze a genomului viral (G+C %)</u> variază în limite largi, fiind cuprinsă la virusurile zootrope între 35 - 74 %. Proporţia G + C are de regulă o semnificaţie taxonomică, deşi în unele cazuri în cadrul aceluiaşi grup pot exista variaţii mari (la Herpesvirus între 46%- 74 %).

Virusurile cu potenţial oncogen au coeficient G + C mai apropiat de cel al ADN-ului din celulele de mamifere (G + C = 4o %). De exemplu, la Adenovirusuri coeficientul este de 48 % la tulpinile foarte oncogene, de 52 % la cele slab oncogene şi de 58 % la tulpinile neoncogene.

<u>Mărimea şi greutatea genomului viral</u> diferă în

limite largi de la un virus la altul. Cantitatea genomul viral reprezintă între 3 - 3o % din masa totală a virionilor. La virusurile foarte mici (Parvoviridae) greutatea moleculară a genomului este de 1,2 - 1,8 $.10^6$ dal; la Poxviridae genomul are cea mai mare greutate moleculară, de cca 2oo . 10^6 dal.

Conţinutul în informaţie genetică este în concordanţă directă cu mărimea genomului viral, numărul genelor variind de la un virus la altul, între 3 gene (la Poliomavirus) şi 16o gene (la Poxvirusuri).

<u>Configuraţia spaţială</u> a macromoleculei de acid nucleic este la cele mai multe virusuri <u>liniară</u>. La unele virusuri genomul poate avea însă o configuraţie <u>circulară</u> (v.encefalomiocarditei goarecelui). El poate prezenta un anumit număr de răsuciri superhelicoidale suplimentare (fig.35), dînd macromoleculei un aspect circular suprarăsucit (Papovaviridae). La unele virusuri circularizarea genomului se produce numai în anumite faze din ciclul de viaţă; de exemplu, înainte de pătrunderea virionilor în celulă. Circularizarea în această fază este probabil o condiţie prealabilă pentru integrarea în genomul celulei gazdă(Herpesviridae, Adenoviridae).

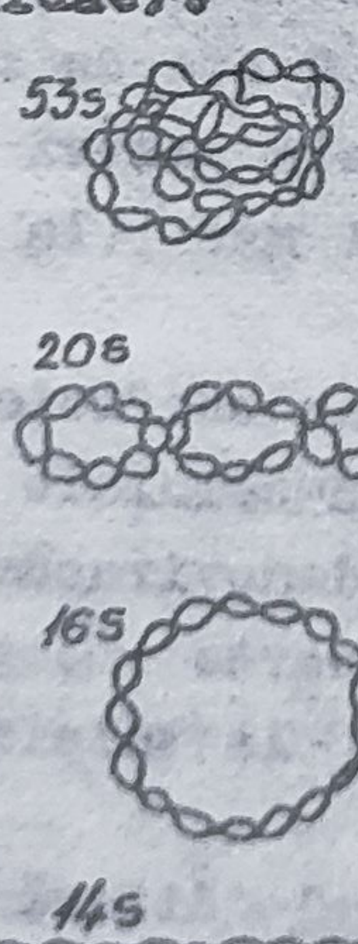


Fig.35.- Tipuri de configuraţie a acidului nucleic la v.poliema (în funcţie de viteza de centrifugare): circlică suprarăsucită (1 şi 2), circlică circulară (3) şi liniară (4).

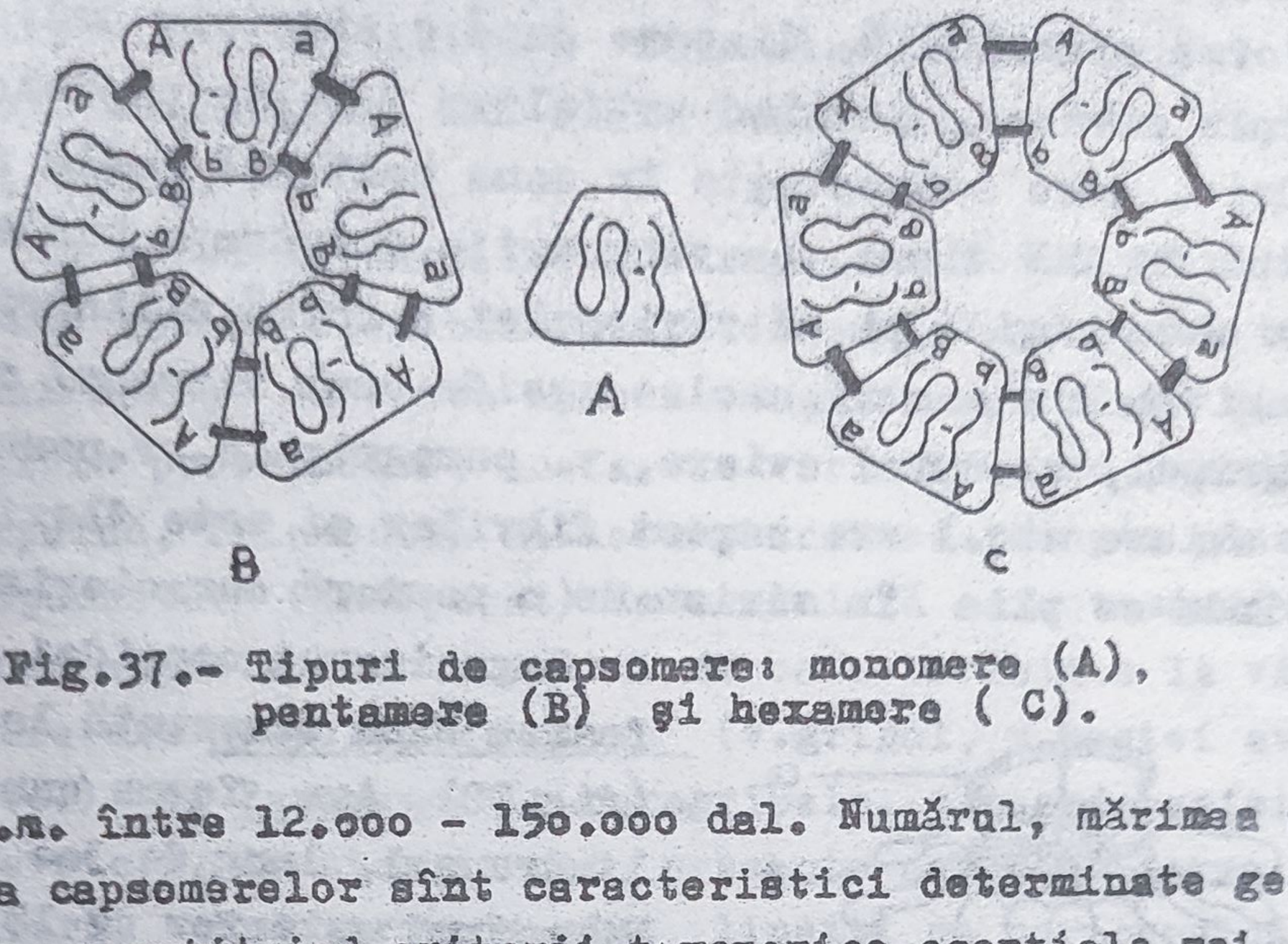


Fig.37.- Tipuri de capsomere: monomere (A), pentamere (B) şi hexamere (C).

cu g.m. între 12.000 - 150.000 dal. Numărul, mărimea şi forma capsomerelor sînt caracteristici determinate genetic, constituind criterii taxonomice esenţiale mai ales la virusurile de formă icosaedrică.

Constituirea învelişului capsidal dintr-un număr mare de capsomere impune aranjarea lor după reguli de simetrie foarte precise, de aşa manieră încît toate capsomerele să-şi exprime la fel caracteristicile stereochimice. Numai aşa devine posibilă armonizarea şi asamblarea lor într-o structură ordonată, simetrică şi unitară. Realizarea învelişului capsidal este facilitată şi de faptul că, polipeptidele care formează capsomerele sînt molecule mari, uşor deformabile. Ca urmare, dispunerea simetrică şi potrivirile stereochimice dintre capsomerele învecinate determină formarea unei structuri armonioase, ordonate, organizată după o <u>simetrie helicală</u> sau <u>cubică</u>, ceea ce dă virionului "nud" o formă caracteristică: <u>cilindrică</u> sau <u>icosaedrică</u> (izodiametrică).

3.3.2.1. <u>Simetria helicală</u>. Este caracteristică pentru ribovirusurile de formă cilindrică, alungită — sau care au o nucleocapsidă de formă fibrilară

(filamentoasă). La acestea învelişul capsidal este constituit dintr-un număr foarte mare de capsomere identice, de formă sferoidală, dispuse după o simetrie helicelă în spirale strînse, formînd astfel un înveliş proteic cilindric, care adăposteşte în zona centrală goală filamentul de ARN viral. La virusurile fitotrope nucleocapsida este rigidă şi dă virionului o formă cilindrică alungită; din contră, nucleocapsida unor virusuri zootrope (v.gripal, v.postei aviare, v. paragripale, v.pseudopestei aviare etc.) are aspect fibrilar şi este flexibilă, putîndu-se plia în virion de o manieră caracteristică.

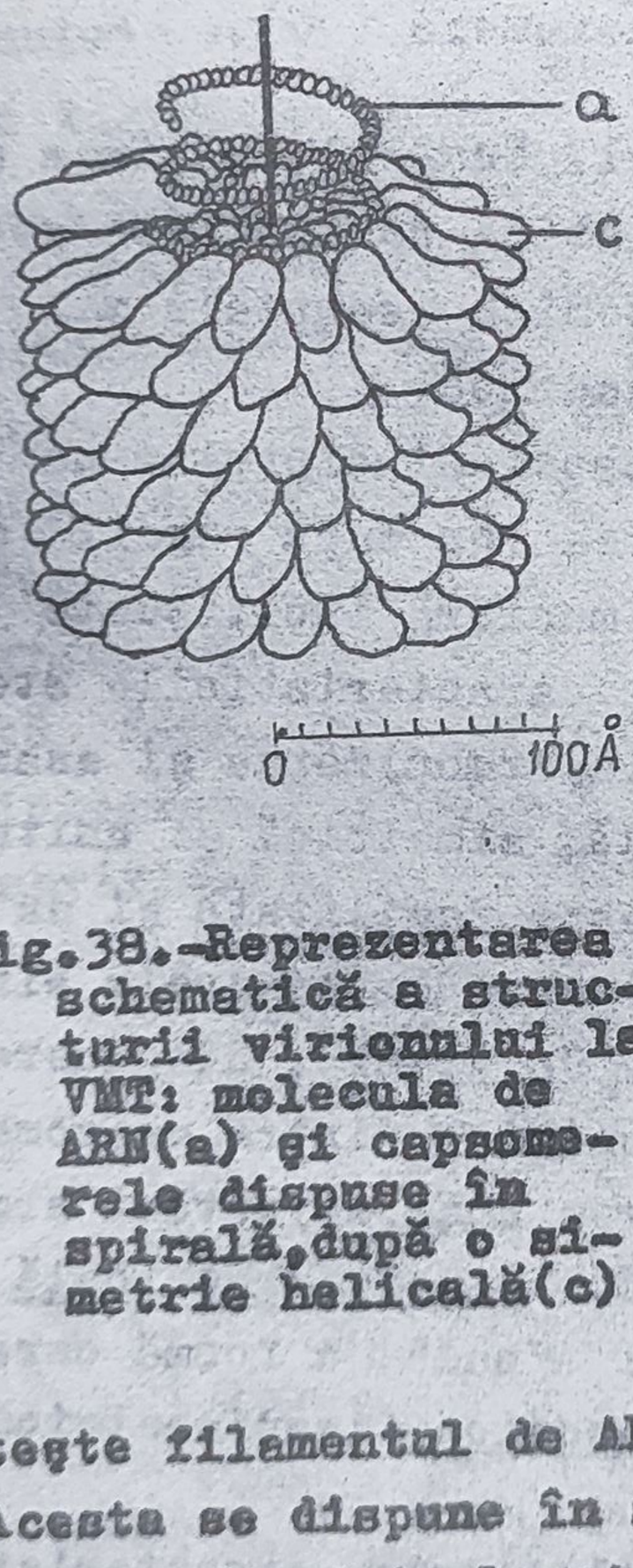


Fig.38.-Reprezentarea schematică a structurii virionului la VMT: molecula de ARN(a) şi capsomerele dispuse în spirală, după o simetrie helicală(c)

Organizarea capsidei este foarte bine cunoscută la VMT (fig.38). Are forma unui cilindru gol, lung de 300 nm, cu diametrul exterior de 18 nm. Este formată din 2130 de capsomere elipsoidale, dispuse în spirală, cu pesul de 2,3 nm (16,1/3 capsomere formează o spirală). Fiecare capsomeră este formată din o moleculă polipeptidică (cu g.m. 17.000 dal) în structura căreia intră 158 de aminoacizi, ordinea de succesiune a acestora fiind perfect cunoscută.

Zona centrală a capsidei cilindrice este goală şi are o rază de 2 nm. Ea adăposteşte filamentul de ARN m.c. format din 6390 nucleotide. Acesta se dispune în spirală, urmînd fidel structura capsidei, fiind inclavat în spaţiul asemănător cu un "şanţ" format între capsomerele elipsoidale. Pe fiecare tur molecula de ARN viral are 49 nucleotide. Rezultă astfel că

fiecare capsomeră este asociată cu trei nucleotide, lungimea capsidei, implicit a virionului, fiind astfel determinată de lungimea ARN-ului viral (date citate după ZARNEA, 1983).

In cazul virusurilor zootrope de formă fibrilară, cu nucleocapsidă flexibilă, capsida are o structură tubulară mai laxă, datorită interacţiunilor mai slabe dintre moleculele proteice. De aceia, la virionii care posedă pericapsidă, filamentul nucleocapsidal se găseşte pliat şi "împachetat" (înfăşurat) de o manieră caracteristică. Asemenea aspecte sînt deosebit de caracteristice la virusurile din grupele Orthomyxo (v.gripal, v.pestei aviare etc.) şi Paramyxo (v.paragripale, v.pseudopestei aviare etc.). Acestea se pot prezenta sub două forme: fibrilară, cînd virionii sînt lipsiţi de pericapsidă şi sferoidală cînd virionii sînt "acoperiţi" cu înveliş pericapsidal. La aceştia, filamentul nucleocapsidal, organizat după o simetrie helicoidală, este situat în zona centrală a virionului, fiind pliat şi răsucit uniform asemănător cu "aţa pe un ghem".

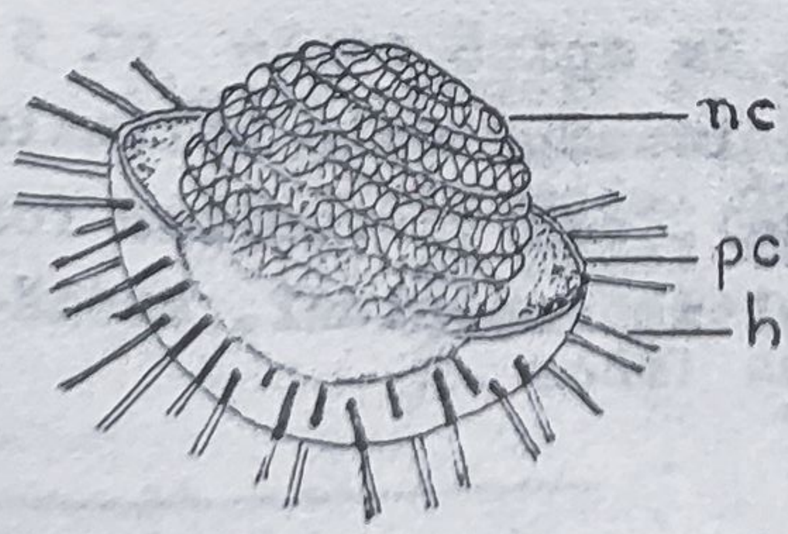


Fig.39.Reprezentare schematică a structurii virionului la Orthomyxovirusuri: nucleocapsida cu simetrie helicală şi aspect fibrilar este răsucită ca "aţa pe ghem"(nc); pericapsida(pc) şi hemaglutininele (h).

Dintre virusurile cu simetrie helicală, virusurile din grupul Rhabdo (v.stomatitei veziculoase, v. rabic s.a.) au, de asemenea, unele caracteristici de organizare şi structură mai deosebite. Virionii au o formă cilindrică alungită asemănătoare cu un "glonte" sau "obuz" (fig.4o). Forma este determinată în special de modul de pliere a nucleopeidei. Genomul,constituit din o macromoleculă de ARN m.c. dispusă helicoidal, este protejat de un înveliş proteic capsidal, format din capsomere aranjate în dublu strat, după o simetrie helicală. Rezultă o nucleocapsidă care se rulează regulat, în spire egale,pe direcţia unui canal axial; spre un capăt al virionului cîteva spire descresc în diametru,dînd capătului respectiv o configuraţie hemisferică.La virusul stomatitei veziculoase nucleocapsida formează 3o ture de spiră egale şi încă 4 ture cu diametru descrescînd, iar la virusul rabic formează 28 ± 2 ture de spiră egale şi 5 ture cu diametrul descrescînd. Nucleocapsidele helicale, acoperite de învelişul pericapsidal, dau virionilor forma cilindrică, cu un capăt plan şi altul sferoidal, asemănătoare cu un"glonte "sau "obuz".

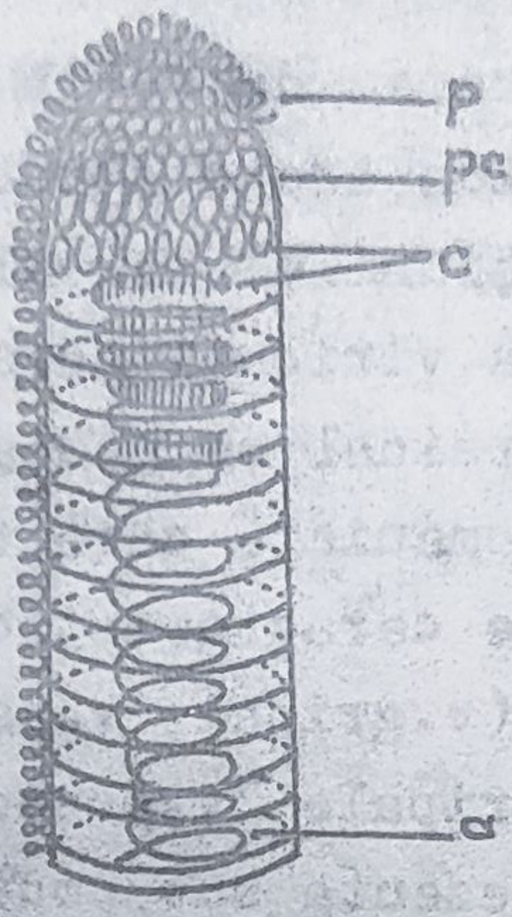


Fig.4o. Reprezentare schematică a structurii la Rhabdovirus: ARN m.c. helicoidal (a),capsidă helicoidală formată din capsomere dispuse în dublustrat(c), pericapsida (pc) şi peplamerele (p).

3.3.2.2 . Simetria icosaedrică (cubică) este caracteristică virusurilor de formă izodiametrică,poliedrică sau sferoidală. La acestea capsomerele se aranjează

spaţial simetric, pe direcţia axelor unui cub. Ca urmare, capsida virusurilor icosaedrice are de regulă o formă poliedrică, cu contur hexagonal, de tipul unui icosaedru[1] cu 20 de feţe triunghiulare echilaterale plane. La unele virusuri icosaedrale capsomerele se găsesc însă situate la distanţe radiale egale de centrul particulei, rezultînd astfel o capsidă cu feţe triunghiulare convexe, care dau virionilor o formă sferoidală. Alăturat sînt redate cîteva modele ipotetice de virioni cu capsidă icosaedrală (fig. 41).

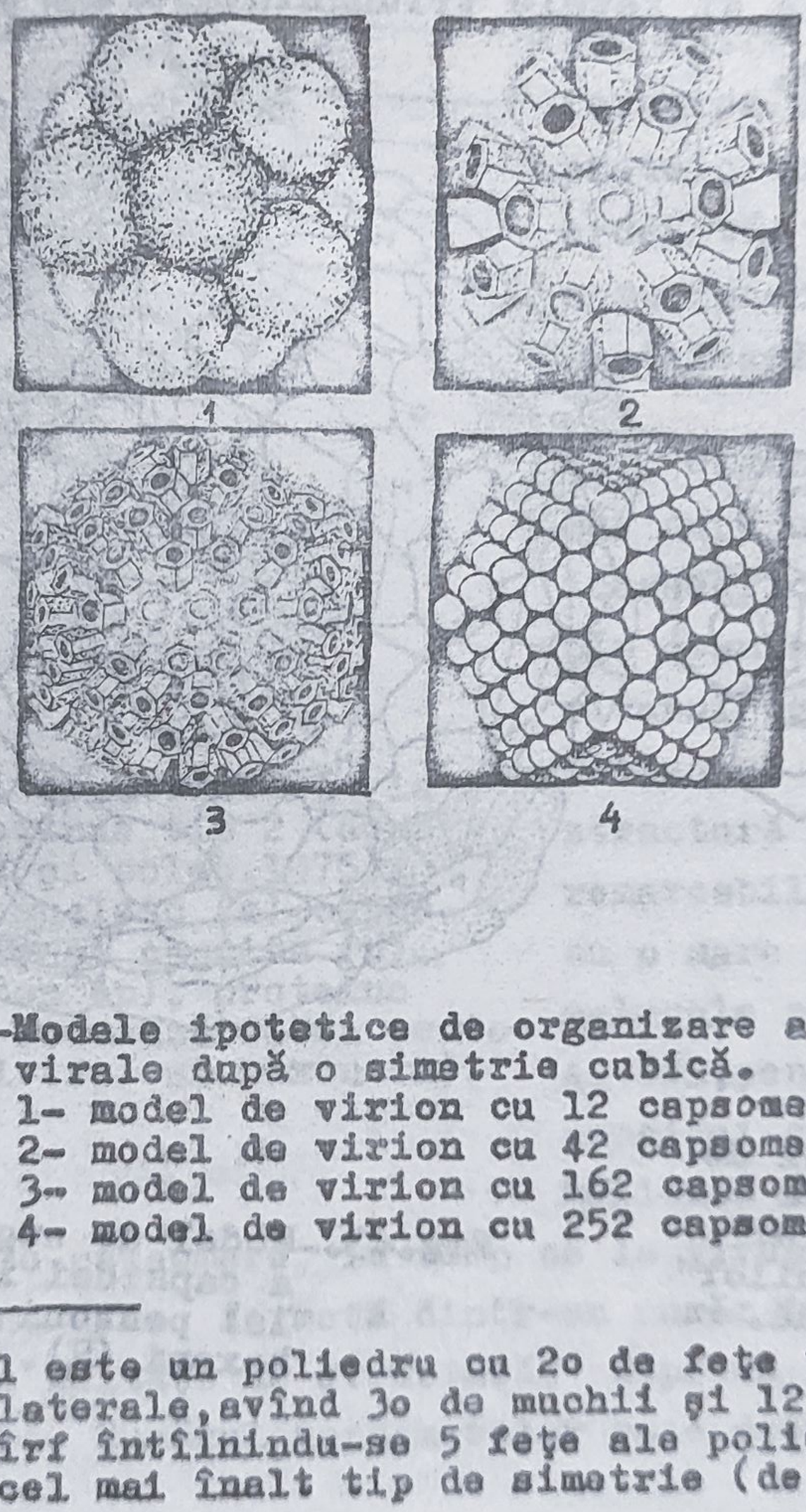


Fig.41.-Modele ipotetice de organizare a capsidei virale după o simetrie cubică.
1- model de virion cu 12 capsomere
2- model de virion cu 42 capsomere
3- model de virion cu 162 capsomere
4- model de virion cu 252 capsomere.

---

1) Icosaedrul este un poliedru cu 20 de feţe triunghiulare echilaterale, avînd 30 de muchii şi 12 vîrfuri, în fiecare vîrf întîlnindu-se 5 feţe ale poliedrului. Prezintă cel mai înalt tip de simetrie (de tip 5:3:2)

La virusurile icosaedrice capsomerele sînt de două tipuri: pentoni sau pentamere (formate din 5 polipeptide) şi hexoni sau hexamere (formate din 6 polipeptide). Polipeptidele au de regulă o formă elipsoidală, iar prin legarea în serie, una la alta, formează capsomere cu contur pentagonal, respectiv hexagonal (fig.37).

Pentonii au o formă mai uşor diformabilă, ei fiind situaţi la cele 12 vîrfuri ale capsidei icosaedrale, fiecare stabilind legături stereochimice cu 5 hexoni. Hexonii ocupă laturile şi feţele triunghiulare ale icosaedrului (fig.42 şi 43).

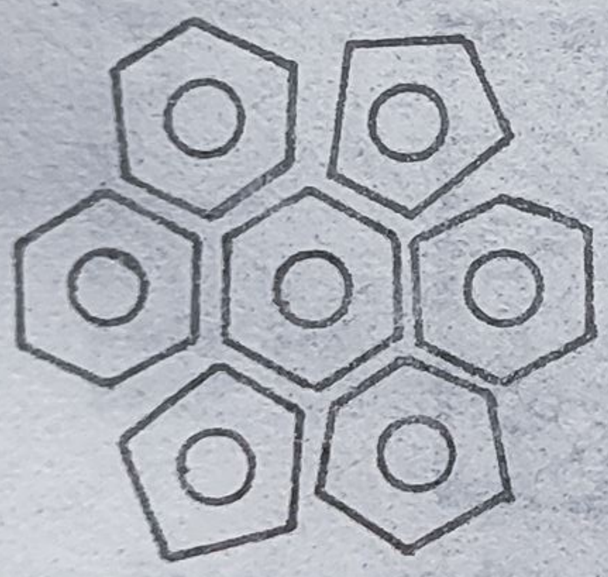


Fig.42.-Model de asociere a "pentonilor" şi "hexonilor" în capsidă.

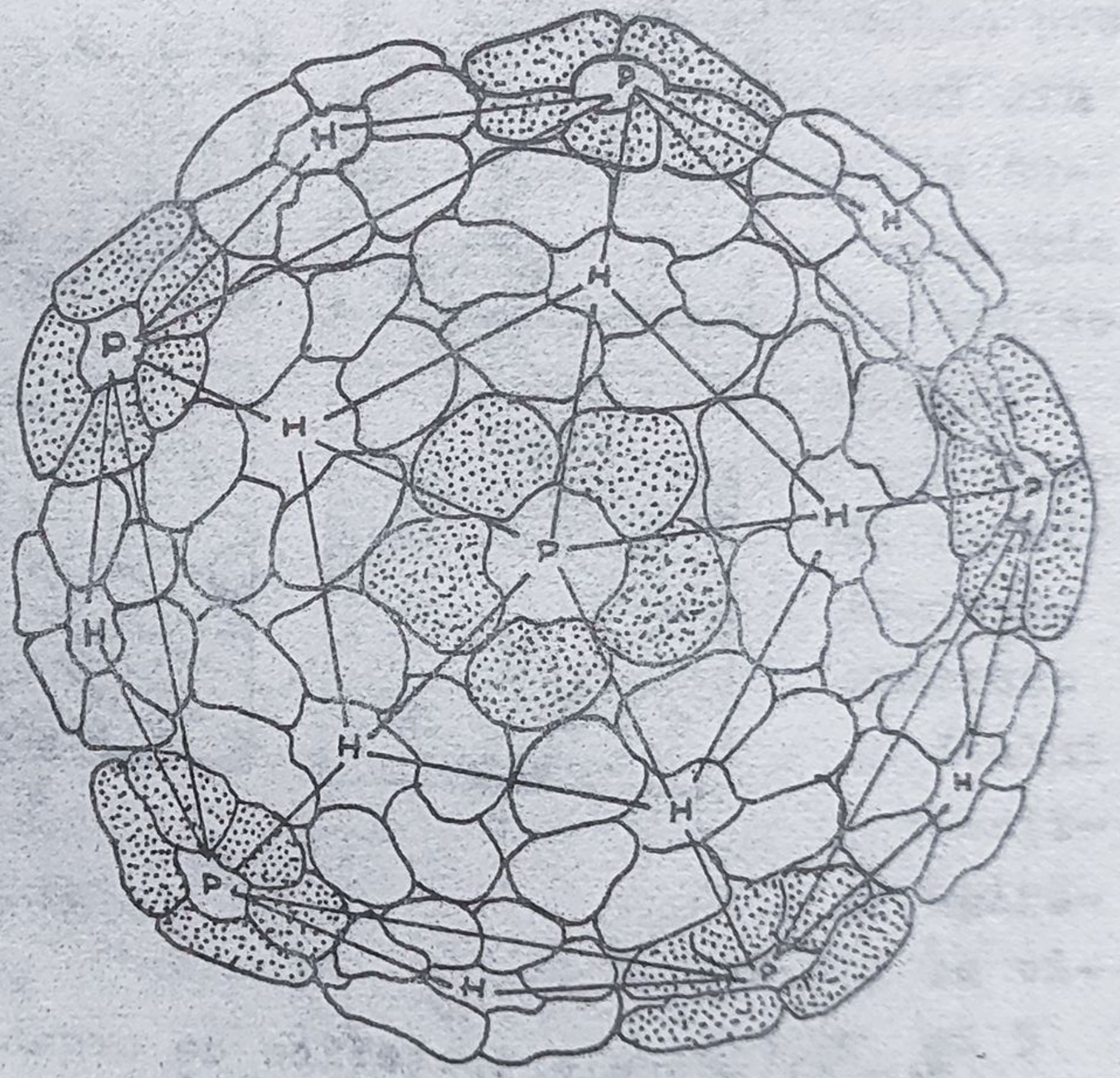


Fig.43.-Model de organizare a capsidei icosaedrale: pentoni (P) şi hexoni (H).

La Adenovirusuri, structura capsidei este ceva mai complexă. Ea conţine şi o proteină de forma unei fibre fine legată de baza pentonului (cu grosime de 2,5 nm şi lungime între 10 - 30 nm, variabilă de la un serotip la altul); aceasta se termină cu o formaţiune care are aspect de "buton" (cu diametru de 4 nm)(fig.44).

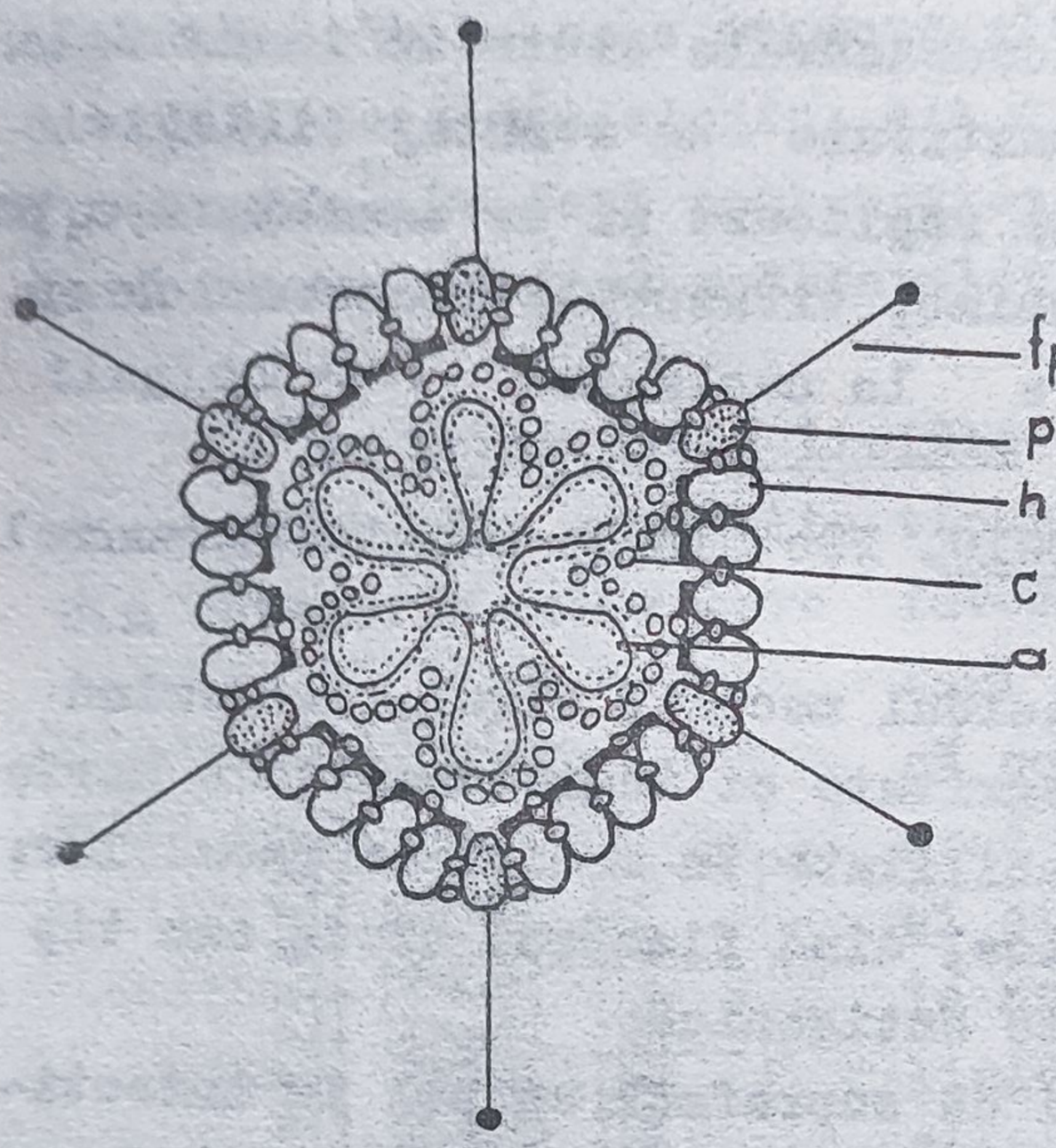


Fig.44.Model de structură la Adenovirus tip 2 (după BROWN şi colab.1975): acid nucleic (a), capsomerele şi capsida (c), penton (p), proteina care formează fibra pentonului (fp) şi hexon (h).

Alcătuirea capsidei icosaedrice este determinată genetic, iar modalităţile specifice de legare a capsomerelor între ele duc la formarea unui înveliş proteic cu o structură ordonată, simetrică, care înconjoară şi protejează genomul viral.

Organizarea capsidei după o simetrie icosaedrică are multiple aventaje biologice, virusul putîndu-şi sintetiza şi organiza o structură de înveliş remarcabil de stabilă, cu o mare economie de molecule proteice. Astfel, pentru formarea capsidei cu simetrie helicală la VMT sînt necesare 2130 capsomere, în timp ce la virusurile icosaedrice capsida este formată dintr-un număr incomparabil mai redus de unităţi de structură, cuprins între 12 - 252 capsomere. Numărul capsomerelor este determinat

genetic şi, ca urmare, este variabil de la un grup de virusuri la altul (fig.41) De exemplu, capsida virusurilor din grupul Picodna este formată din 12- 32 capsomere, a virusurilor Papova din 42 - 72 capsomere, a virusurilor REO din 92 capsomere, a virusurilor Herpes din 162 capsomere, iar a virusurilor Adeno din 252 capsomere. Organizarea capsidei icosaedrale dintr-un număr relativ mic de capsomere constituie un avantaj biologic deosebit în procesele de replicare şi de asamblare a particulelor virale. In schimb, virusurile icosaedrice au o sensibilitate mai mare la nucleaze.

3.3.2.3. ROL BIOLOGIC. Proteinele capsidale au rol biologic complex:

- protejează acidul nucleic viral, conferind virusurilor "nude" integritate şi individualitate morfo-biologică şi o mare stabilitate în mediul extracelular;
- sînt antigenice, dînd fiecărui virus sau tip de virus o specificitate antigenică;
- unele grupări de suprafaţă au rol în infectivitatea virală, prin mijlocirea lor virionii fixîndu-se pe receptorii de la suprafaţa membranei celulare. Ca urmare, proteinele capsidale sînt implicate în determinarea tropismului virusurilor pentru anumite ţesuturi şi specii animale. De altfel, rolul acestor grupări în procesul de agresiune virală este confirmat de faptul că, dacă se blochează prin anticorpi grupările antigenice de suprafaţă virionii îşi pierd proprietatea de a se adsorbi la suprafaţa celulei şi ca urmare, infecţia nu se poate realiza.

Pe lîngă proteinele capsidale, majoritatea virusurilor izometrice şi cele cu structură complexă conţin, în proporţie mai redusă, una sau cîteva tipuri de <u>proteine interne</u>. Cele mai multe sînt asociate genomului şi au rol în menţinerea condensată a ADN-ului

viral. De asemenea, pot conţine unele proteine-enzime (exo şi endonucleaze, polimeraze ADN sau ARN etc.) dar care nu au rol metabolic (plastic şi energetic).

3.3.3. PERICAPSIDA (PEPLOSUL sau ANVELOPA). Multe virusuri au la exterior un învelis pericapsidal de natură glico-lipo-proteică, denumit şi peplos sau anvelopă. Subunităţile sale structurale sînt foarte puţin individualizate morfologic, ele fiind denumite generic "peplomere". De fapt pericapsida are o structură trilamelară caracteristică membranelor, în alcătuirea sa distingîndu-se:

- un strat dublu lipidic (bimolecular) continuu, constituit din mai multe tipuri de lipide, preponderent din categoria celor care favorizează formarea de structuri strîns legate, capabile să confere învelişului un grad ridicat de organizare şi stabilitate (sfingolipide, la unele virusuri glicosfingolipide, acizi graşi cu lanţ foarte lung de 16 - 26 C, colesterol etc.);

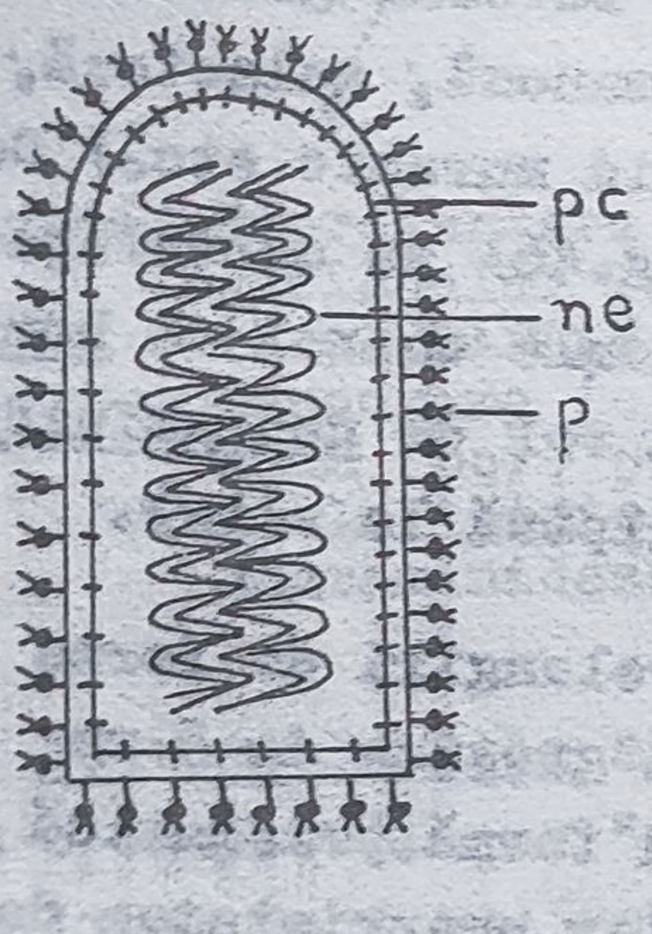


Fig.45-Reprezentarea schematică a virionului la Rhabdovirus: nucleocapsida (nc) şi pericapsida (pc) cu peplomerele (p).

- un strat proteic dispus la faţa internă a lipidelor, format predominant dintr-un polipeptid cu greutate molec. mică, denumit proteina " M " (proteina de "membrană"). Lipidele situate spre exterior asigură protejarea acestui strat de degradarea proteolitică.

Prin caracteristicile sale, învelişul pericapsidal are un veritabil caracter de "unitate de membrană". De exemplu, la Orthomyxovirusuri (v.gripal ş.a.)stratul

dubla lipidic are o grosime de 6 nm şi reprezintă pînă la 2o % din greutatea virionului, Stratul sau "matricea" proteică are tot o grosime de 6 nm, dar reprezintă cantitativ pînă la 4o % din greutatea virionului (în structura sa intră 3.ooo - 4.ooo molec. de proteină "M" cu g.m. pînă la 25.ooo dal).

Pe suprafaţa pericapsidei se găsesc un număr mare de componente glico-proteice cu g.m. între lo.ooo - loo.ooo dal., care apar sub forma de proeminenţe sau spicule şi au proprietăţi de hemaglutinine şi neuraminidază. De regulă, acestea au aspectul unor prelungiri, capătul liber fiind drept sau de forma unui buton . Partea lor hidrofobă este inclavată în stratul lipidic pericapsidal. Ele sînt constituite dintr-un schelet polipeptidic, la care se leagă lateral glucide în proporţie de 5-4o % (formate din manoză, galactoză, fucoză, N-acetilglucozamină, uneori acid muramic etc.) De exemplu, la Orthomyxovirusuri (fig.46) pe suprafaţa virionului se găsesc 5oo - looo spicule cu rol de hemaglutinine şi 5o - 2oo spicule cu rol de neuraminidază (variabile ca număr de la o tulpină la alta).

Hemaglutininele sînt prelungiri de forma unui bastonaş, cu capătul drept, cu grosime de 5 nm şi lungime de 16 nm. Pe secţiune au formă prismatică triunghiulară. Ele conferă virionilor proprietatea de a se putea adsorbi la suprafaţa hematiilor, producînd apoi hemaglutinarea lor. De asemenea, au rol important în fixarea virionilor la suprafaţa celulelor receptive, contribuind astfel la iniţierea procesului de infectivitate virală; participă apoi în procesul de "înmugurire" şi eliberare a virusului din celulă.

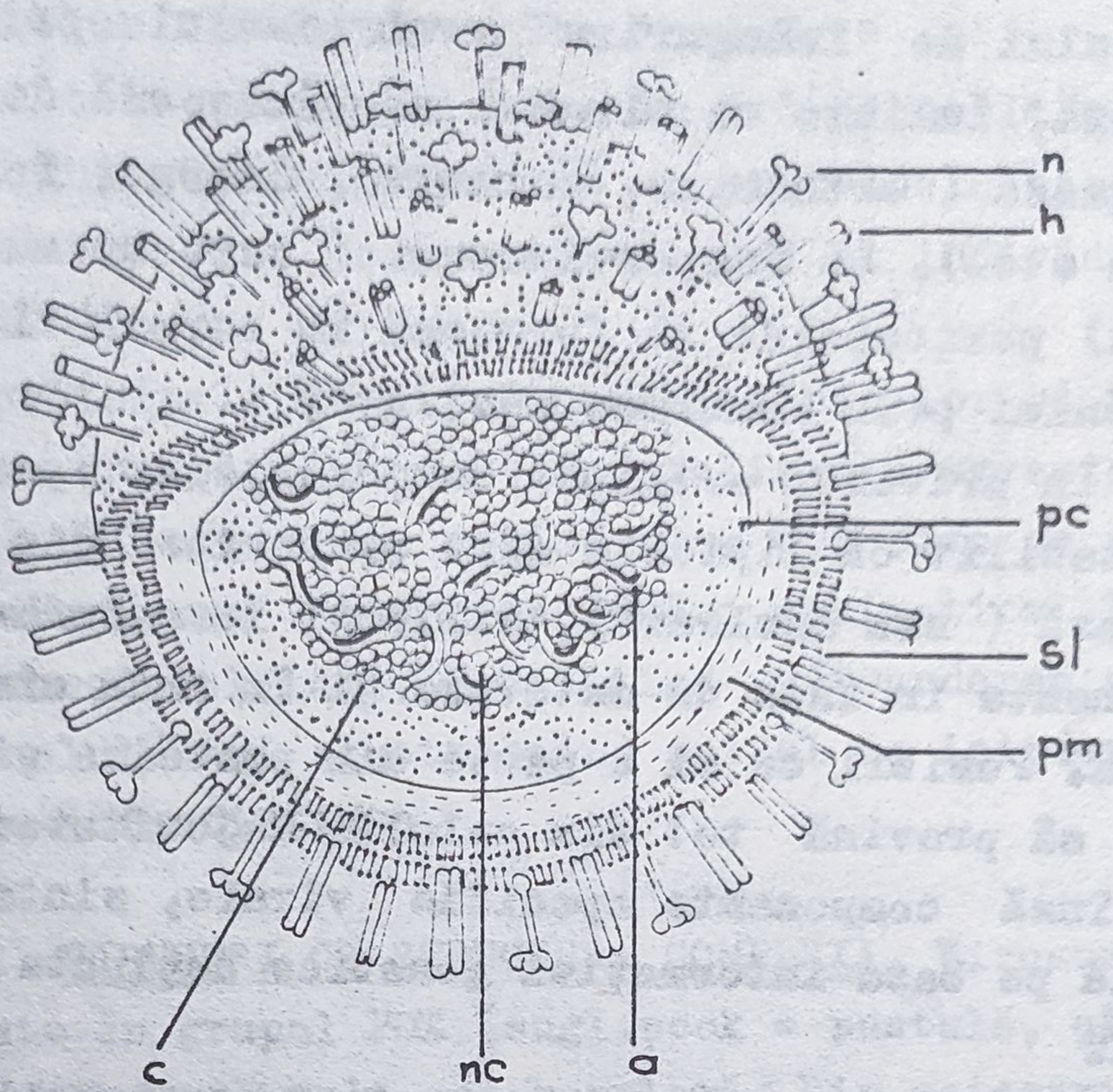


Fig.46.-Reprezentare schematică a structurii virionului la Orthomyxovirus (v.gripal) (după KAPLAN şi WEBSTER, 1979): ARN (a), Capsomere (c), nucleocapsidă (nc), pericapsidă (pc), proteine matrice (pm), strat dublulipidic (sl), hemaglutinină (h) şi neuraminidază (n).

Neuraminidazele sînt prelungiri care se asemănă cu o ciupercă; au "piciorul" lung de 10 nm, iar capătul liber de forma unui "buton" cu diametru de 4 nm. Rolul lor este mai puţin precizat. Prin funcţiile lor enzimatice dezintegrează acidul neuraminic din membrana celulară a hematiilor, determinînd astfel hemoliza. Este posibil să aibă un anumit rol şi în infectivitatea virală, facilitînd pătrunderea virusului în celulă.

Invelişul pericapsidal se formează în faza finală de maturare a virionului şi la ieşirea sa din celulă. La cele mai multe virusuri se formează chiar în cursul

procesului de "înmugurire" a virionului prin membrana celulară, înainte ca virusul să părăsească definitiv celula gazdă (Orthomyxo, Paramyxo, Ocorna, Toga, Rhabdo, Corona etc.). La Herpesvirusuri (care se multiplică în nucleu) pericapsida se formează în cursul "înmuguririi" virionului prin membrana nucleară.

In privinţa originii componentelor pericapsidale s-a stabilit că lipidele sînt provenite din membrana celulară (sau nucleară), virionii însuşindu-şi aceste componente în faza de maturare şi în faza cînd părăsesc celula. Posibil ca şi o parte din proteine şi glico-proteine să provină tot din celulă. Majoritatea acestora sînt însă componente specific virale, sintetizate în celulă pe baza informaţiei genetice deţinute de genomul viral.

La Poxvirusuri formarea structurilor lipoproteice de suprafaţă nu este încă pe deplin elucidată, dar totalitatea componentelor din membrana externă par să fie specific virale şi nu de provenienţă celulară.

ROL BIOLOGIC. Pericapsida este un înveliş cu structură bine conturată morfo- chimic şi cu rol biologic important şi complex. Chiar şi lipidele, deşi sînt de provenienţă celulară, sînt profund integrate în bistructura virionului, participînd la conferirea integrităţii sale morfo-biologice. Acest fapt este confirmat de constatarea că delipidarea unor virusuri, prin tratarea cu eter - cloroform, duce la inactivarea lor. Prin urmare, pericapsida îndeplineşte un important rol protector, asigurînd păstrarea integrităţii virionilor. De altfel, stratul dublu lipidic situat la exteriorul virionului protejează proteinele virale faţă de enzimele proteolitice, precum şi faţă de acţiunea nocivă a altor enzime şi substanţe chimice. Fac excepţie virusurile din grupele Orthomyxo şi Paramyxo care îşi pot pierde pericapsida, fără să fie afectată viabilitatea, respectiv infectivi-

tatea particulelor virale devenite "nude".

Componentele pericapsidale, în mod deosebit proteinele, sînt antigenice. Împreună cu proteinele capsidale ele conferă virusurilor specificitatea şi individualitatea antigenică.

Glicoproteinele de tipul hemaglutininelor şi neuraminidazei au un rol important în realizarea agresiunii virale. Prin mijlocirea lor virionii se pot fixa pe receptorii celulari sau determină lezări enzimatice la nivelul membranei celulare, facilitînd pătrunderea virusului în celulă şi contribuind astfel la iniţierea procesului de infectivitate.

3.3.4. <u>VIRUSURI CU STRUCTURA COMPLEXA</u>. Virusurile mari încadrate în grupul POX (engl.pock = pustulă, ulceraţie) au o structură mult mai complexă. Din categoria lor fac parte numeroase virusuri patogene pentru om şi animale: v. variolei umane, v. veriolei bovine, v.variolei ovine, v. difterovariolei aviare., v.vaccinal, v.ectromeliei, v.fibromului Shope ş.a. Cel mai bine studiat şi cunoscut este virusul vaccinal.

Poxvirusurile au în general o formă care se aseamănă cu o cărămidă cu colţurile rotunjite. Virionii <u>virusului vaccinal</u> au dimensiuni de 22ox 22o x 28o nm; în structura lor intră ADN d.c. (5-6%), proteine (pînă la 89 %) şi lipide (fosfolipide, colesterol, grăsimi neutre). Micro-electronografiile efectuate pe secţiuni ultrafine executate prin virioni (fig.46) au relevat că <u>în zona centrală se găseşte un nucleoid bine definit</u>,de forma unui disc oval biconcav (pe secţiune se aseamănă cu cu o halteră); lateral, în adînciturile de pe feţe se găsesc două formaţii ovoide sau " corpi laterali", a căror natură chimică şi rol sînt încă necunoscute.

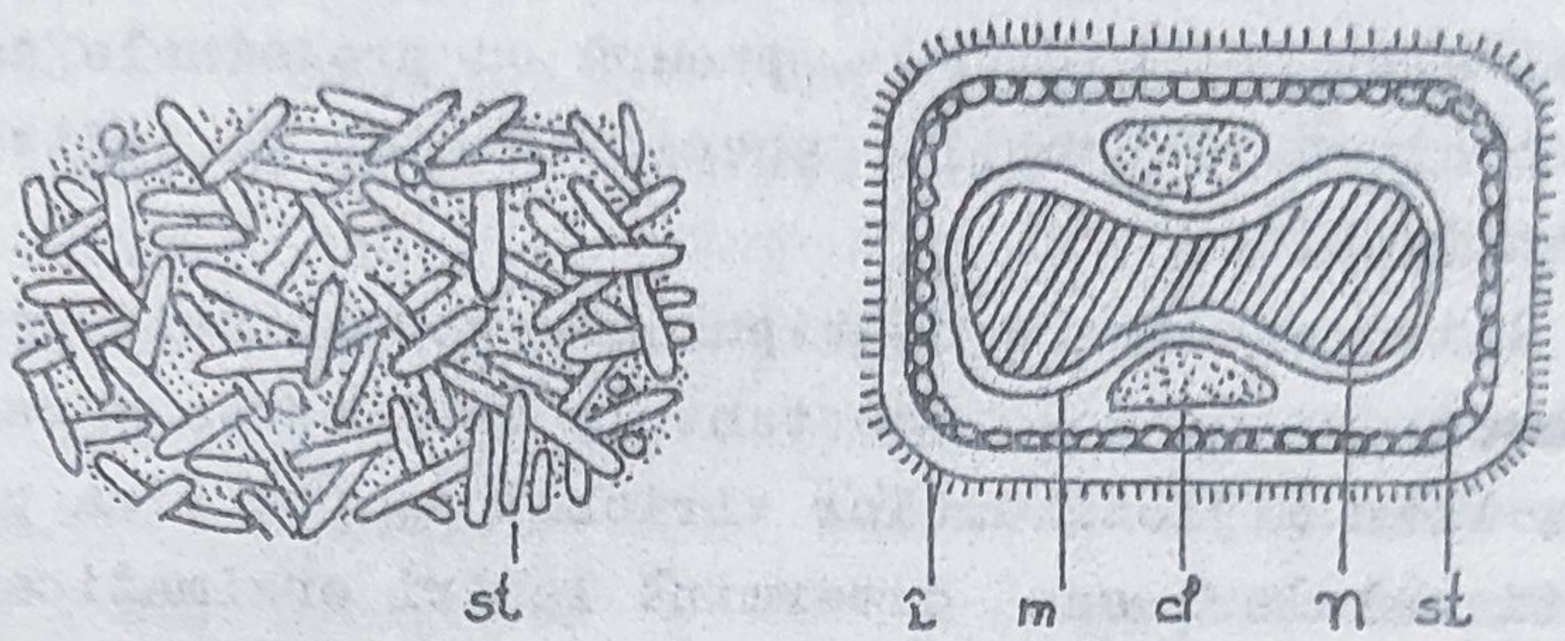


Fig.46. Reprezentare schematică a structurii la Poxvirus (după Horne, 1978): nucleoid (n) membrana internă (m) corpi laterali (cl), stratul structurilor tubulare (st), învelişul extern cu proecţii de suprafaţă(î).

Nucleoidul conţine genomul viral. Este constituit dintr-o moleculă de ADN d.c., care are o configuraţie liniară şi o lungime de 87 - 1oo micrometri(este cel mai mare ADN viral cunoscut). Acest genom conţine în structura sa informaţia genetică necesară pentru codificarea cîtorva sute de tipuri de proteine, din care cca 2o - 3o tipuri sînt proteine structurale. Nu se cunoaşte încă bine modul în care este aranjată şi împachetată în nucleoid macromolecula foarte lungă de ADN. Ea se găseşte însă asociată cu numeroase proteine care sînt probabil implicate în menţinerea genomului în stare condensată. La aceasta contribuie şi faptul că nucleoidul este învelit de o membrană proprie, în stuctura căreia se distinge un strat sau membrană internă cu aspect omogen (cu grosime de pînă la 5 nm) şi un strat extern format din subunităţi cilindrice (cu dimensiuni de 5 x 1o nm) dispuse într-un aranjament regulat.

Nucleoidul şi corpii laterali sînt acoperiţi apoi

de un înveliş sau membrană externă (de suprafaţă) bine definită, de natura lipoproteică, cu aspect striat caracteristic. Toate componentele care alcătuiesc structurile de suprafaţă ale virionului sînt specific virale, (nu provin din membrana celulară), sinteza lor fiind specificată de virus. Aspectul striat al membranei externe este dat de faptul că în structura sa se disting electronooptic submnităţi de forma unor "tubuli", aparent aranjate la întîmplare, constituind un strat gros de 15 nm. Pe suprafaţa membranei se găsesc proeminenţe de natură glico-proteică, a căror sinteză se pare că este specificată tot de virus.

Poxvirusurile conţin în structura lor şi anumite enzime: exo şi endonucleaze, proteinkinaze etc.

3.3.5. <u>ENZIME CONTINUTE DE VIRUSURI</u>. Virusurile sînt lipsite de sisteme enzimatice cu rol în biosinteză şi în producerea de energie. Ca urmare, ele nu pot desfăşura o activitate metabolică proprie, independentă, fiind parazite obligate endocelular. Totuşi, la unele virusuri s-au identificat cîteva tipuri de enzime, unele specific virale (sintetizate pe baza informaţiei genetice virale), altele de proveniență celulară, adsorbite la structurile sau la suprafaţa virionilor în cursul asamblării şi maturării lor. La virusurile mari, în special la Poxvirusuri, majoritatea acestor enzime sînt specific virale. In tabel sînt redate principalele tipuri de enzime identificate la unele grupe de virusuri (date după ZARNEA, 1983).

Grupul de virusuri	Tipuri de enzime identificate
Pervirusuri	Endo şi exonucleaze, ARN polimerază (transcriptază), nucleotid-fosfohidrolaze I şi II, protein-kinaze, ATP-ază, guanil şi metil-transferază.
Orthomyxovirusuri Paramyxovirusuri	Neuraminidază, ARN - polimerază dependentă de ARN.
Rhabdovirusuri Reovirusuri	ARN - polimerază dependentă de ARN
Oncovirusuri (virusuri encogene)	Reverstranscriptază, endonucleaze, ligaze, transferaze, kinaze
Adenovirusuri	Endonucleaze

Majoritatea enzimelor specific virale sînt implicate în mecanismele agresiunii virale, unele avînd rol-aşa cum s-a mai arătat-în fixarea şi pătrunderea virionilor în celulele receptive (neuraminidaza), altele la iniţierea replicării acidului nucleic viral imediat după eliberarea sa în celulă (ARN-transcriptazele, reverstranscriptaza etc.); la virusurile encogene, enzimele virale servesc la integrarea genomului viral în genomul celular (endonucleazele la Adenovirusuri şi la virusul SV 4o etc.).

<u>Neuraminidaza</u> a fost prima enzimă identificată la v.gripal(HIRST,1942). Este o glico-proteină (di sau tetramră) care la Orthomyxo şi Paramyxovirusuri formează spiculele de la suprafaţa pericapsidei. Sinteza sa este specificată de genomul viral.

Neuraminidaza îndeplineşte funcţii complexe:

facilitează agresiunea virală, în primul rînd prin degradarea mucoproteinelor care acoperă şi protejează epiteliul căilor respiratorii; participă la fixarea virionilor pe receptorii de la suprafaţa celulelor, pe care apoi îi degradează(prin clivarea unor legături glicozidice dintre acidul neuraminic şi D-galactoză şi D-galactozamină) contribuind astfel la pătrunderea virusului în celulă;este implicată în procesele de asamblare şi maturare a virionilor, iar după "înmugurirea" acestora(prin membrana celulară) dezintegrează receptorii de care virionii sînt fixaţi. Virionii astfel eliberaţi îşi pot relua ciclul de infectare a celulelor învecinate. Se consideră că neuraminidaza intervine în conferirea patogenităţii şi în realizarea agresiunii virale şi prin alte mecanisme încă insuficient elucidate.

ARN-polimerazele (transcriptazele), prezente la virusurile ADN şi la virusurile cu genom $ARN^{(-)}$, mediază sinteza de ARNm, iniţiind replicarea genomului viral imediat după eliberarea sa în celulă.

Reverstranscriptaza (ADN-polimeraza dependentă de ARN) este o enzimă specific virală, caracteristică retrovirusurilor (virusurilor ARN oncogene). Are rol în transcrierea "inversă" a genomului ARN într-o macromoleculă de ADN, care apoi se poate integra în genomul celular sau serveşte ca matriţă pentru sinteza de molecule noi de ARN viral (TEMIN şi BALTIMORE,1972).

Endonucleazele virusurilor ADN oncogene (Adenovirus, SV 4o) au, de asemenea, rol în oncogeneză, participînd la integrarea ADN-ului viral în genomul celular. La celelalte virusuri endonucleazele sînt implicate în mai multe procese: participă în procesele de replicare; au rol în menţinerea împachetată a genomului viral (McAUSLAN, 1975); intervin în procesele de recombinare genetică; la Poxvirusuri se consideră că au rol în blocarea replicării genomului celular etc.

4. B A C T E R I O F A G I I

Bacteriofagii sînt virusuri parazite pentru bacterii. Au o largă răspîndire în natură, găsindu-se obişnuit în toate mediile naturale în care trăiesc bacteriile: ape, sol, conţinut intestinal la om şi animale etc. Pătrunderea şi multiplicarea lor în celulele bacteriene sînt procese complexe care decurg rapid şi se finalizează prin liza (dezintegrarea) bacteriilor.

Fenomenul de "liză transmisibilă" a fost descoperit în culturile de stafilococ de TWORT (1915), iar ulterior în culturile de bacili Shiga de d'HERELLE (1917). Ultimul stabileşte că procesele de liză sînt produse de un virus pe care îl denumeşte "bacteriofag" sau "fag" (mîncător de bacterii).

Descoperirea bacteriofagilor a stîrnit de la început un interes viu în rîndul cercetătorilor, sperîndu-se în posibilitatea utilizării lor în terapia infecţiilor. Deşi în această direcţie speranţele nu au fost pe deplin confirmate, bacteriofagii şi fenomenul de bacteriofagie şi-au găsit totuşi multiple aplicaţii practice. Stricta specificitate de acţiune a fagilor a făcut posibilă utilizarea lor la identificarea şi tipizarea speciilor bacteriene, lizotipia (tipizarea prin fagi) fiind utilizată curent şi pe scară largă în lucrările de diagnostic bacteriologic, în investigaţiile epidemiologice şi în taxonomie.

După 1940, sub conducerea lui DELBRUCK, studiul fagilor şi a fenomenului de bacteriofagie a stat în atenţia unui grup special de cercetători, ceea ce a marcat începutul unei perioade de mari descoperiri în domeniul virusologiei şi al geneticii microbiene şi moleculare, Un eveniment remarcabil prin implicaţiile sale l-a reprezentat descoperirea mecanismului infectivi-

tăţii fagice (HERSHEY şi CHASE, 1952). S-a deschis astfel calea spre cunoaşterea şi elucidarea mecanismelor infectivităţii virale.

De importanţă fundamentală a fost şi stabilirea, pe ADN extras de la fagi, a structurii duble catenare a macromoleculei de ADN, precum şi descoperirea pentru prima dată în "sistemul fag-bacterie" a existenţei de ARNm ("mesajer"), ceea ce a permis elucidarea modalităţii de transfer a informaţiei genetice de la cromozom la ribozomi şi a mecanismelor de biosinteză a proteinelor.

In concluzie, se poate spune că fagii şi "sistemele fag-bacterie" au devenit modele experimentale de o mare valoare şi de o permanentă actualitate atît în cercetările de virusologie cît şi de genetică microbiană şi moleculară, contribuind la elucidarea multor probleme de interes fundamental.

4.1. CARACTERISTICILE GENERALE ALE BACTERIOFAGILOR. Investigaţiile de mare fineţe din ultima perioadă au dus la concluzia că bacteriofagii sînt foarte mult diversificaţi morfo-structural. Cei mai mulţi fagi au formă spermazoidală caracteristică. In structura lor se distinge o formaţiune mai voluminoasă, poliedrică (icosaedrică) cu contur hexagonal, numită "capul fagului", care conţine genomul viral; la aceasta se găseşte ataşată o formaţiune cilindrică numită "apendice caudal" prin intermediul căreia fagul se fixează pe bacterie.

Proteinele care alcătuiesc aceste morfo-structuri sînt organizate după o simetrie binară; în peretele "capului" capsomerele sînt dispuse după o simetrie icosaedrică, iar în "apendicele caudal" după o simetrie helicoidală.

Au fost identificate însă şi alte tipuri de fagi, unii de formă incosaedrică şi fără apendice caudal, iar alţii de formă filamentoasă (fără cap). De altfel,

pe baza caracteristicilor morfo-structurale, fagii se pot constitui în 17 grupuri, cele mai importante tipuri morfologice fiind redate în figura alăturată (fig.47).

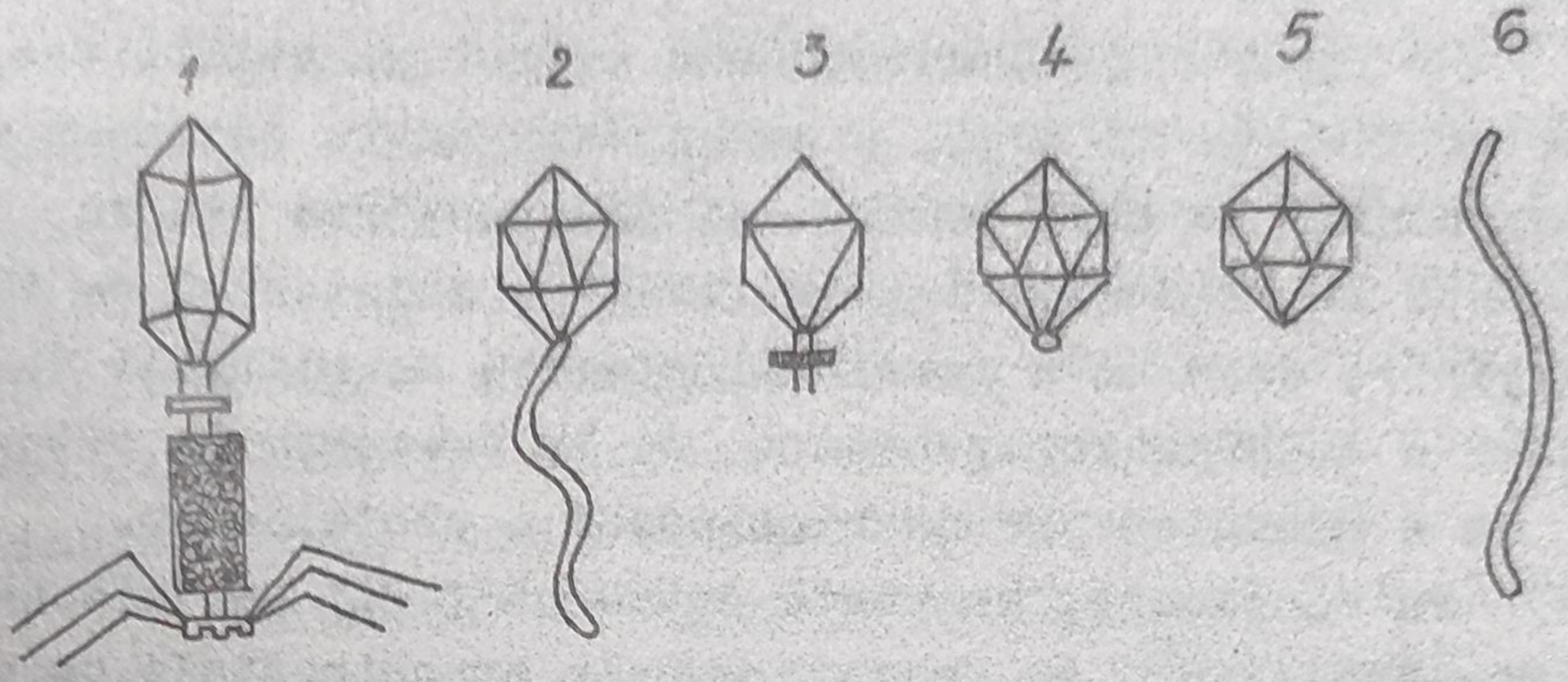


Fig.47.-Tipuri de bacteriofagi:cu coadă contractilă(1), cu coadă lungă necontractilă (2) cu coadă scurtă (3), fără coadă (4,5) şi filamentoşi (6).

Bacteriofagii sînt foarte diversificaţi şi în privinţa genomului lor. Majoritatea au <u>genom ADN d.c.</u> liniar (fagii din seria T,λ , Ø 80, P_2 etc.) sînt însă tipuri de fagi cu <u>genom ADN m.c.circular</u> (Ø X 174, S13, M 13, f_1, fd etc.), alţii cu <u>genom ARN m.c.liniar</u> (f2, MS2, R17, M12, Qβ, FI etc.) şi excepţional cu <u>genom ARN d.c. segmentat</u> (Ø 6).

Marea diversitate a genomurilor fagice este foarte bine reflectată de mărimea şi conţinutul lor în gene. Genomul celor mai mici fagi ARN "masculi" conţine doar 3 gene, în timp ce la fagii mari poate conţine peste 150 gene.

Spre deosebire de virusurile zootrope, genomurile fagilor conţin frecvent nucleotide cu baze neobişnuite, cum sînt: 5-hidroximetil-citozina (care substituie citozina) sau 5-hidroximetil-uracil şi 5-4, 5-dihidroxipentil-uracil. Se pare că aceste baze au rol în protejarea genomului faţă de nucleazele celulare.

Dintre bacteriofagi, cei mai amplu studiaţi sînt fagii paraziţi pentru E.coli. Aceştia sînt încadraţi în prezent în lo familii, cei mai bine cunoscuţi fiind fagii anticolibacilari din seria T, în mod deosebit cei din seria T-par (T2, T4 etc.)

4.2. FAGUL T_4 . Este luat de regulă ca prototip în studiul fagilor, fiind cel mai amplu cercetat şi mai bine cunoscut.

4.2.1. Caracteristici morfo-structurale." Capul fagului" este o formaţiune poliedrică, pe secţiune hexagonală, cu dimensiuni de 1oo/65 nm. Forma sa nu este exact cunoscută, dar se aseamănă cu un icosaedru alungit, prin intercalarea la mijloc a unui segment de prismă hexagonală.

Capsomerele care alcătuiesc peretele capului au diametru de 5,o nm, dar numărul şi modul lor de aşezare sînt necunoscute. Se consideră că ele se ordonează după o simetrie icosaedrică.

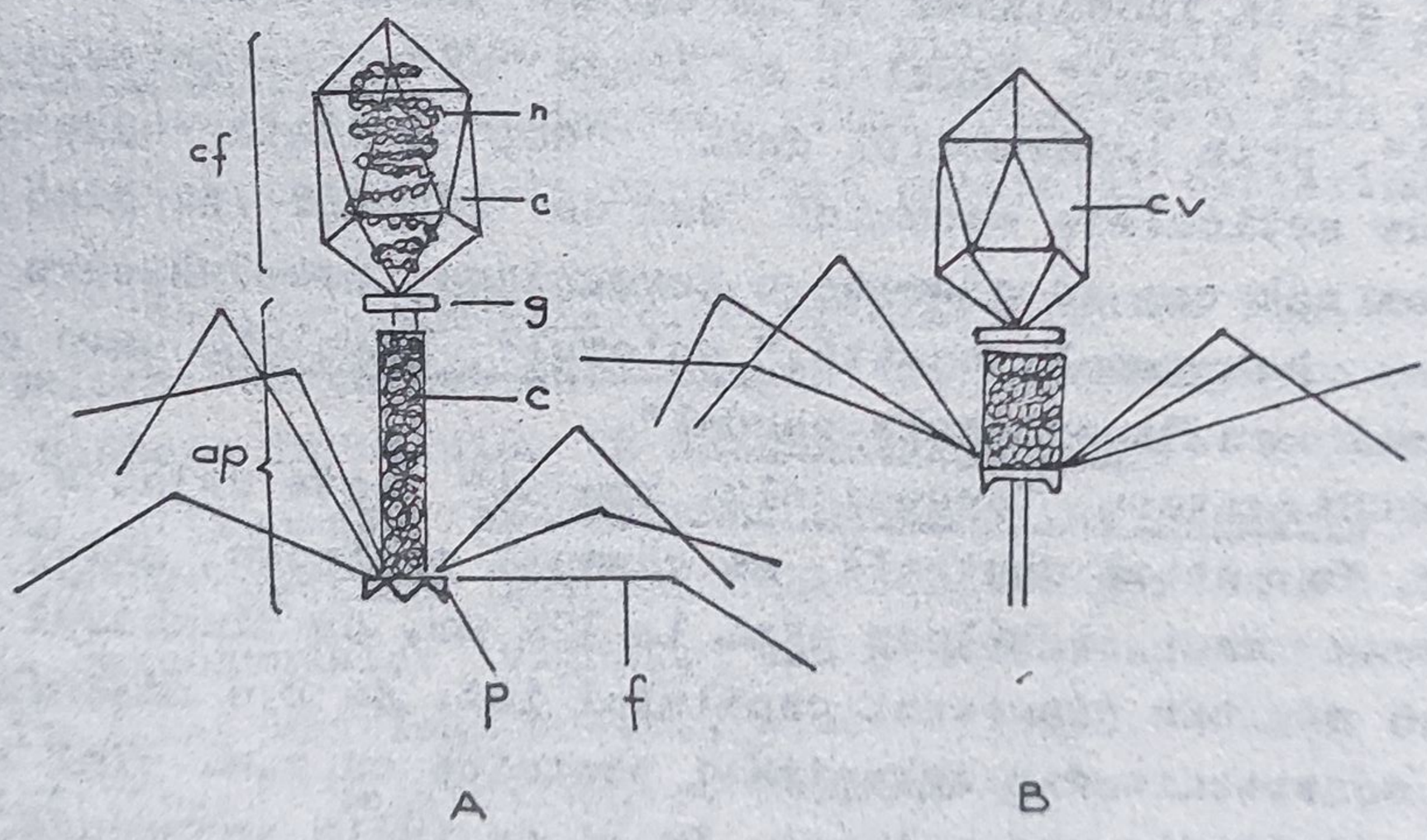


Fig.48.-Structura fagului T2, cu coada relaxată(A) şi contractată(B); capul fagului(cf), apendicele caudal(ap), acidul nucleic (n), capsida(c), gulerul(g), coada(c), placa terminală cu croşetele(p), fibrele cozii(f).

In interiorul "capului" se găseşte genomul, constituit dintr-o macromoleculă liniară de ADN d.c., cu lungimea de 5o micrometri (g.m. de 1,2 x 10^7) care conţine până la 2oo gene.

"Capul" mai conţine câteva tipuri de proteine: o proteină internă cu g.m. mică(între 3oo - 1ooo molecule) reprezentînd 1 % din totalul proteinelor fagului, un polipeptid acid(între 1ooo - 3ooo molec.) şi două poliamine (34oo molec. de spermidină şi 62.ooo molec. de putrescină) (ZARYBNICKY,1973; citat după ZARNEA, 1983).

Macromolecula de ADN este pliată şi împachetată foarte strîns. Ea este menţinută în "capul" fagului în stare densificată şi sub presiune prin interacţionarea cu proteinele cu care se găseşte asociată. Se apreciază că ruperea acestor interacţiuni, la contactul fagului cu bacteria, ar putea genera forţele de presiune necesare la expulzarea ADN-ului prin canalul apendicelui caudal şi la inocularea sa în celula bacteriană.

La "capul" fagului se leagă "gîtul apendicelui caudal", prin intermediul unui "dop" proteic care are rol de articulare mecanică sau de "adaptor de simetrie". Imediat sub cap se găseşte o formaţiune asemănătoare cu un disc hexagonal, numită "gulerul" fagului, care se continuă cu "apendicele caudal".

Structura "apendicelui caudal" este relativ complexă. In partea centrală se găseşte cilindrul axial, de forma unui tub(lung pînă la 12o nm, cu diametrul ext. de 7,5 nm, iar diametrul canalului int. de 2,o nm)acesta este constituit din subunităţi proteice cu g.m. pînă la 2o.ooo dal dispuse helical, în 24 de inele suprapuse, fiecare inel fiind format din 6 subunităţi proteice. Cilindrul axial este înconjurat de o teacă contractilă cilindrică (lungă de 8o nm şi cu diam. de 16,o nm), formată din 144 capsomere dispuse după simetrie helicoidală tot în 24 de inele suprapuse în "şurub", fiecare inel

fiind constituit la fel din cîte 6 capsomere.

Cînd fagul se fixează pe celula bacteriană, aranjamantul şi legăturile dintre capsomere permit contractarea tecii, ceea ce duce la scurtarea sa la aproximativ jumătate (35 nm) şi la lărgirea diametrului ei interior (la 25 nm).

La capătul apendicelui caudal se găseşte placa bazală, de formă hexagonală. Aceasta are şi ea o structură complexă, fiind formată din cel puţin 15 tipuri de proteine. La colţurile plăcii se găsesc 6 cîrlige sau croşete care au rolul de a fixa ireversibil fagul pe bacterie.

Tot la placa bazală sînt fixate fibrele cozii. Acestea sînt structuri proteice filamentoase foarte fine şi lungi (gros. de 2,o nm şi lung. de 13o nm). Se găsesc dispuse la suprafaţa apendicelui caudal sub formă de reţea, ele fiind ataşate de "guler" prin legături slabe. In faza premergătoare fixării fagului pe celula bacteriană fibrele cozii se desprind de la guler şi de pe teacă, rămînînd ataşate numai la placa bazală. Ele apar ca picioarele la un paianjen, avînd rolul de a fixa fagul la receptorii de la suprafaţa peretelui bacterian.

4.2.2. INFECTIVITATEA FAGICA. Fixarea fagilor la suprafaţa bacteriei este urmată de inocularea acidului lor nucleic în celulă. In interiorul acesteia genomul fagic acţionează ca material genetic autonom, subordonînd şi deviind metabolismul celulei gazdă spre sinteza componentelor virale, din asamblarea cărora rezultă în final noi fagi maturi, Acest ciclu, definit ca multiplicare vegetativă, se termină prin liza celulei bacteriene şi eliberarea fagilor în mediul ambiant. In desfăşurarea proceselor se disting mai multe faze:

4.2.2.1. FAZA DE ADSORBTIE ŞI FIXARE A FAGILOR PE CELULA BACTERIANA. Fagii ajunşi prin ciocniri în contact cu celula bacteriană se fixează la suprafaţa acesteia iniţial prin intermediul fibrelor cozii. In această fază procesul de fixare are o specificitate relativă şi este reversibil, dar devine specific şi ireversibil îndată ce fagul se fixează pe receptorii de la suprafaţa peretelui bacterian prin intermediul croşetelor plăcii bazale.

Ca receptori pentru fagi pot acţiona componente chimice foarte variate, prezente la suprafaţa peretelui bacterian, cum sînt lanţurile lipo-polizaharidice la bacteriile Gram-negative sau acizii teicoici (care se găsesc legaţi covalent la mureină) la bacteriile Gram-pozitive. Unii fagi se pot fixa pe componentele chimice capsulare, pe flageli şi pili, iar fagii ARN „masculi" pe pilii de sex.

Inocularea genomului fagic în celula bacteriană. După fixarea ireversibilă a fagului pe celula bacteriană survin interacţiuni între componentele din placa bazală şi cele din receptorii pentru fag, care generează modificări rapide în aranjarea subunităţilor proteice din teaca cozii. Ca urmare, teaca se contractă şi se scurtează determinînd proiectarea cilindrului axial al apendicelui caudal, care penetrează peretele bacterian. Concomitent, macromolecula de acid nucleic din capul fagului este expulzată şi forţată să treacă prin canalul cilindrului axial în celula bacteriană. Mecanismele şi forţele care realizează inocularea genomului fagic în bacterie sînt necunoscute, dar procesul decurge foarte rapid, avînd la fagul T_4 o durată de cca 15 secunde. O dată cu acidul nucleic al fagului, în celula bacteriană trec şi cantităţi mici din unele proteine care se găsesc legate ionic de acidul nucleic.

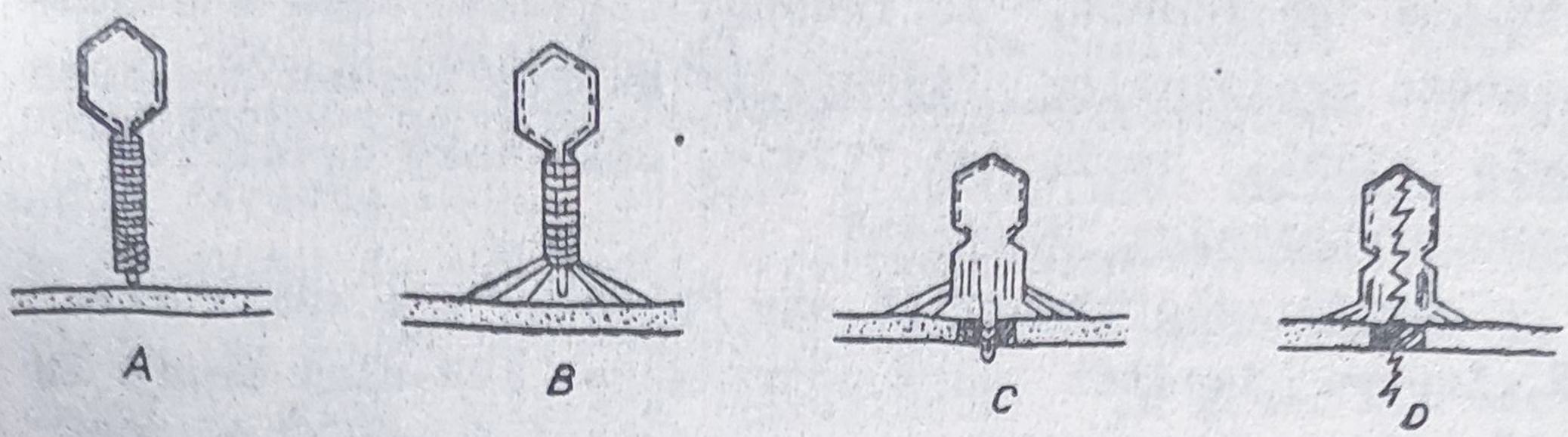


Fig.49.- Mecanismele infectivităţii fagice.Faza de adsorbţie reversibilă (A) şi ireversibilă(B), faza de contracţie a apendicelui caudal cu penetraţia peretelui (C) şi faza de expluzare a ADN-ului fagic în celula bacteriană (D).

Totalitatea acestor procese de adsorbţie, fixare şi inoculare a genomului fagic în bacterie decurg uimitor de repede, ele durînd aproximativ 1 minut, Fagii goliţi de genom se desprind de pe bacterie; ei apar în imaginile electrono-optice ca nişte "umbre" ale fagilor, fiind denumiţi "fagi fantomă".

4.2.2.2. <u>FAZA DE MULTIPLICARE VEGETATIVA</u>. De la inocularea acidului nucleic în celulă şi pînă la apariţia primilor fagi maturi trec aproximativ 2o - 3o minute. In acest interval prezenţa componenteler fagice în celulă nu poate fi evidenţiată şi de aceia perioada este denumită şi <u>faza de eclipsă.</u> De fapt, în această perioadă se petrec <u>procese complexe de multiplicare vegetativă</u>, în cursul cărora pe baza informaţiei genetice deţinute de genomul viral şi sub controlul acestuia se realizează, în etape distincte, sinteza tuturor componentelor virale.

ADN-ul fagului pătruns în celulă funcţionează ca material genetic autonom, independent de cromozomul bacterian, subordonîndu-şi întreaga "maşinărie" metabolică celulară pentru sinteza componentelor sale.

Toate procesele decurg într-o succesiune temporală bine determinată şi perfect reglată, genele fagice intrînd în acţiune coordonat, la început genele care specifică sinteza proteinelor "timpurii" şi replicarea acidului nucleic viral, apoi, mai tîrziu, cele care specifică sinteza proteinelor "tardive".

Proteinele "timpurii" sau "precoce", a căror sinteză începe imediat după pătrunderea ADN-ului fagic în celulă, sînt componente cu proprietăţi enzimatice. Ele sînt implicate în anumite procese de iniţiere şi de început a infectivităţii fagice. Din rîndul lor fac parte:

- proteinele de membrană care se încorporează în peretele bacterian şi au rolul de a stimula biosinteza componentelor parietale, accelerînd astfel procesul de reparare a leziunilor produse de fag. Refacerea rapidă a integrităţii celulei este absolut necesară pentru multiplicarea fagului;

- proteinele - enzime care blochează activitatea metabolică proprie celulei gazdă şi degradează cromozomul. Aceste proteine au rolul de a bloca transcrierea informaţiei genetice celulare în ARNm, ceea ce determină încetarea biosintezei de proteine bacteriene, implicit sinteza de ADN şi ARN bacterian. Unele pot degrada ADN-ul bacterian în fragmente din ce în ce mai mici, în final pînă la nucleotide, o parte a acestora fiind apoi utilizată la sinteza de genomuri fagice;

- proteine - enzime pentru sinteza unor precursori de ADN fagic, cum este 5-hidroximetilcitozina (aceasta necesită biosinteza a cel puţin trei enzime-proteine "timpurii");

- proteine - enzime care participă la replicarea ADN-ului fagic, cum sînt: ADN-polimeraza, polinucleotid-ligaza, nucleazele etc. Genele fagului care specifică sinteza acestora intră în acţiune imediat, pe o durată de 12 minute de la pătrunderea genomului

fagic în celulă.

Replicarea ADN-ului fagic se realizează semiconservativ , prin mijlocirea unui "intermediar de replicare" foarte lung, în care sînt incluse un număr mare de molecule de ADN fagic. Procesele sînt deosebit de complexe şi numai parţial cunoscute. In realizarea lor la fagul T_4 sînt implicate aproximativ 2o gene. Din acest " intermediar de replicare", moleculele de ADN fagic sînt desprinse şi convertite în forme mature înaintea încapsidării lor în capul fagului.

Proteinele "tardive" sînt sintetizate în a doua parte a perioadei de multiplicare vegetativă, după ce ADN-ul viral a ajuns la rata maximă de replicare şi cînd transcrierea genelor timpurii este blocată. De fapt, ARN-ul pentru biosinteza proteinelor tardive se sintetizează pe genele ADN-urilor progene.

Din categoria proteinelor tardive fac parte:

- proteinele structurale ale fagului (la fagul T_4 cel puţin 3o tipuri de proteine) necesare pentru formarea capului şi a apendicelului caudal (cu anexele sale);

- proteinele active care acţionează în procesele de morfogeneză, respectiv de asamblare a fagului;

- proteinele - enzime necesare la liza celulei bacteriene: o lipază (care atacă membrana plasmatică) şi lizozimul (care dezintegrează mureina din peretele bacterian).

4.2.2.3. - FAZA DE MORFOGENEZA SI ASAMBLARE A FAGULUI. In morfogeneza fagului T_4 sînt implicate cel puţin 5o gene, procesele fiind deosebit de complexe şi doar parţial cunoscute. Fagii a căror morfostructură este complexă nu se pot autoasambla. Componentele structurale (genomul, capul, apendicele caudal, fibrele cozii) sînt sintetizate pe căi separate şi în etape distincte. Cu alte cuvinte fagii sînt sintetizaţi şi construiţi

pe "bucăţi", fiecare proces sau etapă fiind controlată de gene diferite. S-a stabilit că asamblarea componentelor fagice se produce pe trei linii principale, care independent duc la formarea <u>capului</u>, a <u>apendicelui caudal</u> şi a <u>fibrelor cozii</u>. In final, din legarea acestor trei componente rezultă fagul matur.

Fiecare parte componentă a fagului se realizează printr-o succesiune de faze intermediare. De exemplu, capul fagului se formează în mai multe etape(precap de tip I, II, III), iar aspirarea ADN-ului în interiorul acestuia se produce numai în faza finală de cap"matur". După aspirarea cantităţii corespunzătoare de ADN, acesta este "tăiat" din "intermediarul de replicare". In procesul de aspirare, pliere, rulare şi supercompactare a ADN-ului fagic intervin anumite proteine. Concomitent cu "împachetarea"ADN-ului, capul fagului se măreşte în volum de 4o - loo %, devenind apt să-şi ataşeze apendicele caudal (produs pe cale independentă).

4.2.2.4. <u>FAZA DE LIZA A BACTERIEI SI DE ELIBERARE A FAGILOR</u>. După cca 22-25 minute de la infecţie, în celula bacteriană se găsesc sintetizaţi un număr mare de fagi (cîteva zeci sau sute). In acest stadiu survine liza bacteriei, procesul fiind determinat în cea mai mare parte de o <u>endolizină</u> de tipul lizozimei, specificată de genomul viral. La fagii din seria T-par (T_2, T_4 etc) endolizina acţionează ca o muraminidază. Ea clivează legăturile dintre acidul N-acetil-muramic şi N-acetilglucozamină, slăbind astfel structura peretelui pînă la limita cînd, sub presiunea osmotică internă celula se sparge, iar fagii se împrăştie în mediul ambiantal.

4.3. <u>FENOMENUL DE LIZOGENIE</u>. Este caracteristic pentru fagi mai puţin virulenţi, definiţi ca <u>fagi</u>

temperaţi. La aceştia procesul de infectivitate poate evolua în două direcţii: spre ciclul productiv-litic care duce, aşa cum s-a arătat, la multiplicarea fagului şi la liza bacteriei sau spre ciclul lizogen, neproductiv, caracterizat prin integrarea genomului fagic în cromozomul celulei bacteriene.

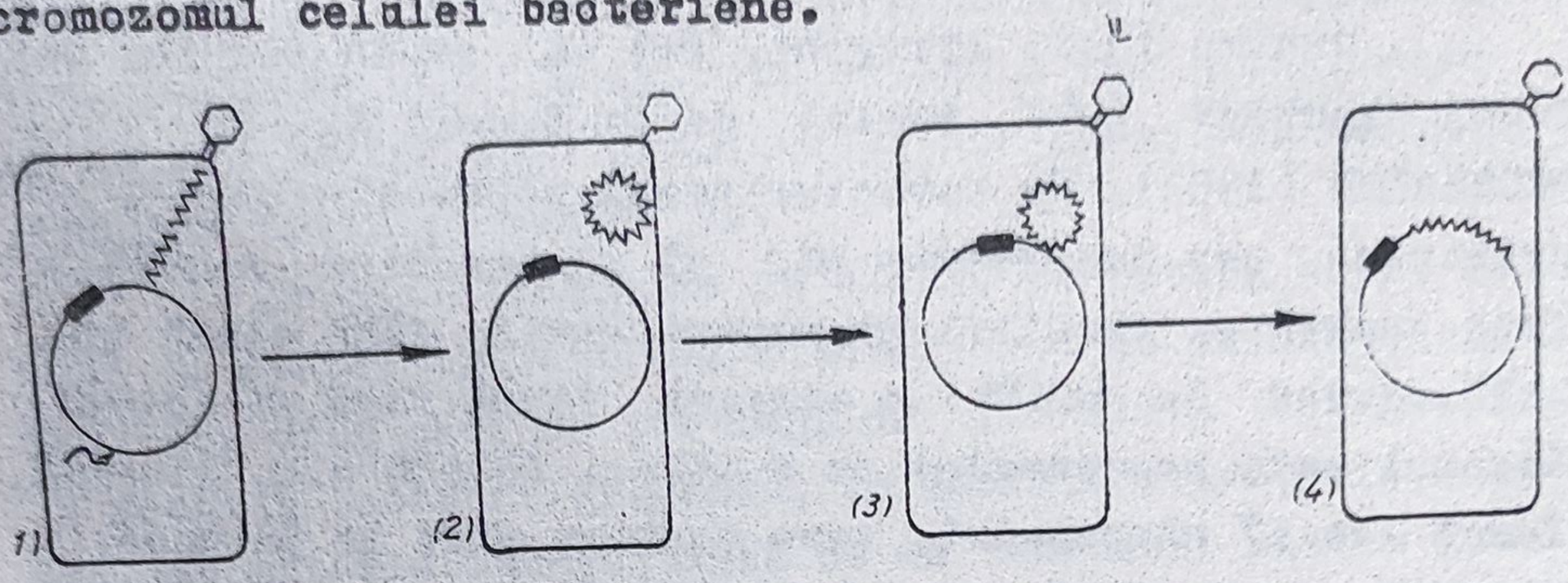


Fig.5o.-Modalităţi de existenţă a ADN-ului fagilor temperaţi în celula bacteriană: inocularea ADN-ului fagic(1), prezenţa în citoplasmă ca material genetic autonom (2), legarea de cromozomul bacterian în locusul din zona învecinată operonului gal (3), integrarea în cromozom şi menţinerea ca profag (4).

In stare integrată, genomul fagic se menţine în celula bacteriană sub o formă "mascată", ca profag, timp nedefinit, replicîndu-se o dată cu cromozomul bacterian şi transmiţîndu-se de la o generaţie la alta, fără să-şi manifeste prezenţa prin fenomene de liză .

Celulele bacteriene purtătoare de "profag" sînt lizogene, întrucît genomul fagic se poate desprinde din cromozom fie spontan (cu o frecvenţă redusă şi fără o cauză cunoscută), fie sub acţiunea inductoare a unor factori fizico-chimici (cu o frecvenţă crescută). Redevenind autonom în citoplasmă, genomul fagului îşi reia ciclul productiv-litic. Ca urmare, după aproximativ o oră, fiecare bacterie eliberează prin liză pînă la 1oo de fagi maturi. Asemenea fenomene de "liză indusă" pot

fi declanşate, de exemplu, prin supunerea bacteriilor lizogene la radiaţii UV şi X sau prin tratarea cu substanţe chimice, cum sînt: peroxizii, iperita azotată, agenţii alkilanţi etc.

Dintre fagii lizogeni, cel mai amplu studiat este fagul "lambda" (λ), izolat de la E.coli K_{12} de LEDERBERG (1951). Se caracterizează morfo-structural printr-un cap icosaedric mic şi un apendice caudal, lung, subţire, flexibil şi necontractil, fără placă bazală, avînd la capăt o singură fibră fină şi scurtă. Genomul este reprezentat de o molec. de ADN d.c. liniară, lungă de 17 micrometri, care conţine pînă la 50 gene. Molecula se termină cu extremităţi monocatenare adezive, lungi de 12 nucleotide complementare una faţă de alta, ceea ce permite legarea capetelor şi circularizarea genomului fagic îndată după inocularea sa în celula bacteriană.

Integrarea genomului fagic circular în cromozomul bacterian se realizează prin recombinare, la nivelul unor „situsuri att" specifice de legare("attachement site") existente pe ambele genomuri. La zona de ataşare genomurile sînt rupte, iar apoi capetele sînt legate încrucişat prin mijlocirea unei integrase virale. Se realizează astfel integrarea ADN fagic în structura cromozomului, rezultînd un cromozom bacterian nou, care conţine " profagul" şi care este cu cca 1 % mai lung decît cromozomul normal.

Celulele bacteriene devin astfel lizogene, ele transmiţînd profagul şi caracterul de lizogenie de la o generaţie la alta. Asemenea bacterii pot cîştiga însă şi alte caracteristici; de exemplu, ele devin rezistente sau imune la infecţia cu fagi omologi, întrucît posibilitatea de replicare a acestora în celulă este blocată printr-o "proteină represor" specificată de gene conţinute de profag. De fapt, un asemenea represor

poate bloca suprainfecţia cu toţi fagii care sînt sensibili la represorul respectiv.

La unele bacterii, lizogenizarea poate determina apoi cîştigarea prin conversie a capacităţii de a secreta toxine; de exemplu, la Corynebacterium diphteriae sînt toxigene numai tulpinile lizogene (tulpinile care nu conţin profag sînt netoxigene, dar îndată ce devin lizogene devin şi toxigene).

Se poate conchide că starea de profag este, alături de starea vegetativă, o nouă formă de existenţă a fagilor, prin care se pot menţine în natură integraţi în genomul bacteriilor-gazdă. In această stare, sistemul profag-bacterie funcţionează ca un veritabil sistem biologic unitar.

Inducţia lizei se realizează ca urmare a desprinderii profagului din cromozom şi a trecerii lui în stare de fag vegetativ, proces care se termină prin multiplicarea fagilor şi liza celulei. Excizia ADN fagic din cromozom este un proces invers celui de integrare, în care acţionează două enzime virale: excizionaza, cu rol de a tăia ADN-ul fagic din cromozom şi integraza cu rol de a unui şi circulariza genomurile secţionate, fagic şi bacterian.

De regulă excizia ADN fagic din cromozom se produce foarte exact. Uneori însă (la o proporţie redusă de 10^{-5} - 10^{-6} celule bacteriene) secţionarea se poate produce anormal, rezultînd o moleculă circulară de ADN fagic care conţine în structura sa şi un fragment de ADN bacterian din zona adiacentă locusului în care a fost inserat genomul fagic. Asemenea molecule hibride, produse prin erori de excizie, formează fagii transductori. Aceştia, prin transducţie, vehiculează "markerii" genetici de la o bacterie la alta, avînd un rol important în procesele de variabilitate bacteriană.

5. ELEMENTE DE BIOLOGIE VIRALA

Virusurile sînt lipsite de sisteme enzimatice cu rol în biosinteză şi în producerea de energie şi de aceia nu pot desfăşura o activitate metabolică proprie, independentă. Ca urmare, ele sînt parazite obligat endocelular, în afara celulelor gazdă comportîndu-se ca entităţi inerte, Multiplicarea lor are loc exclusiv în celulele parazitate, biosinteza componentelor virale realizîndu-se pe seama materiei celulare (acizi aminaţi, nucleotide etc.), prin subordonarea sistemelor efectoare ale celulei (aparat ribozomal, ARN_t, enzime activatoare de aa, sisteme generatoare de energie etc.) Cu alte cuvinte, virusurile sînt multiplicate de celula-gazdă, aceasta fiind subordonată şi obligată să lucreze în conformitate cu informaţia genetică deţinută de virus. Un asemenea comportament exprimă, pe plan biologic, parazitismul absolut care caracterizează toate virusurile.

Ansamblul manifestărilor vitale ale virusurilor constau şi decurg din multiplicarea lor în celulele-gazdă şi de aceia <u>procesul de multiplicare</u> este <u>sinonim celui de infectivitate virală</u>. Calea spre cunoaşterea acestor fenomene a fost deschisă în special de elucidarea mecanismului infectivităţii fagice. S-a stabilit astfel că şi celelalte virusuri, după ce pătrund în celule, blochează genomul acestora şi inhibă specific, de cele mai multe ori aproape total, sinteza constituienţilor celulari (ADN, ARN, proteine), deviind metabolismul celulei spre sinteza aproape în exclusivitate a componentelor virale.

5.1. MULTIPLICAREA (REPLICAREA) VIRUSURILOR

Fenomenele ce se succed din momentul adsorbţiei virusului pe celula receptivă, pînă la faza finală cînd din celula infectată sînt eliberaţi noi virioni maturi, sînt deosebit de complexe şi cu numeroase caracteristici distinctive de la un grup sau virus la altul. In succesiunea evenimentelor se disting mai multe etape sau faze: adsorbţia virionilor, pătrunderea în celulă, decapsidarea, biosinteza proteinelor virale (timpurii şi tardive) şi replicarea genomului, asamblarea (morfogeneza) virionilor şi eliberarea lor din celulă

Fenomenul este definit impropriu ca multiplicare, pentrucă de fapt celula este cea care sintetizează totalitatea componentelor virale. De aceia, în ultima perioadă tot mai mulţi au adoptat termenul de "replicare virală", dar şi acesta nu este total adecvat. Pentru definirea fenomenului se utilizează şi termenul de infectivitate virală, care are însă un sens şi un conţinut mai larg.

5.1.1. ADSORBITA VIRUSURILOR PE CELULA GAZDA.

Pentru pătrunderea virusului în celulă este necesară, în prealabil, adsorbţia şi fixarea virionilor la suprafaţa ei. In proces intervin componente chimice de suprafaţă - celulare şi virale - cu rol de receptori, care prin configuraţia lor complementară (stereo-chimică, electrostatică, geometrică) se leagă specific, realizînd astfel adsorbţia şi fixarea virionului la suprafaţa celulei. Prin urmare, afinitatea virusurilor zootrope pentru anumite celule, definită ca tropism, este determinată de existenţa la suprafaţă celulelor receptive a unor componente chimice receptoare. Fenomenul este mai puţin intens şi specific decît în cazul fagilor, atracţia dintre receptori fiind mai redusă. Din această cauză se apreciază că pentru a

se putea adsorbi virusurile zootrope trebuie să se ciocnească cu celulele receptive de mai multe ori (rata de fixare este stabilită în cazul unor virusuri la $3-5x10^9$). Adsorbţia este însă facilitată de numărul foarte mare de receptori existenţi pe celule. De exemplu, celulele KB au pînă la 10.000 receptori.

Natura receptorilor celulari şi virali diferă de la un caz la altul. De regulă, receptorii celulari interacţionează prin grupările lor fosfat cu grupările aminice de la suprafaţa capsidei sau pericapsidei. Receptorii celulari pentru Myxovirusuri sînt grupări glicoproteice, care conţin şi acid neuraminic, virusul fixîndu-se pe acestea prin intermediul spiculelor neuraminidazice de pe suprafaţa pericapsidei. Receptorii pentru Adenovirusuri sînt polipeptide, adsorbţia şi fixarea virionilor făcîndu-se prin intermediul fibrelor pentonilor. In cazul Poxvirusurilor fixarea pe receptorii celulari se realizează prin structurile tubulare de la suprafaţa virionilor.

5.1.2. <u>PATRUNDEREA VIRUSULUI IN CELULA</u>. Spre deosebire de bacteriofagi, la virusurile zootrope virionii pătrund în celulă integral. Traversarea membranei celulare şi deplasarea rapidă a virionilor în celulă, la locul unde genomul viral poate acţiona eficient (citoplasmă sau nucleu), se realizează prin mecanisme şi strategii diferite în raport cu natura virusului şi a celulelor implicate în proces.[1)]

Imaginile electronooptice au stabilit că pătrunderea virionilor în celulă, deşi diversificată, se realizează prin două mecanisme fundamentale: <u>endocitoza</u> şi <u>fuziunea</u> (DALES, 1978).

---

1). Virusurile fitotrope nu se pot fixa pe celulele vegetale şi nu pot traversa peretele celulozic rigid. Virionii sînt introduşi direct în celulă prin lezarea peretelui de regulă prin înţepăturile produse de insecte.

Endocitoza, definită prin termenul de viropexie, este un proces activ de înglobare a virionilor în celulă, asemănător celui de pinocitoză.

Viropexia este mecanismul predominant de înglobare a virionilor în celulă, caracteristic tuturor virusurilor "nude", precum şi unor virusuri din grupele Ortomyxo, Rhabdo şi Pox. Procesul constă în încorporarea virionului într-o veziculă formată din membrana celulară. Semnalul de declanşare a procesului îl constituie probabil adsorbţia virionilor pe receptori. In jurul acestora se produc reacţii celulare de suprafaţă, asemănătoare unui proces de "alunecare" a membranei celulare pe suprafaţa virionului, la zona de contact formîndu-se o mică invaginare care progresează spre interior pînă cînd virionul este închis într-o vacuolă citoplasmatică. Peretele vacuolei se dezintegrează apoi rapid, eliberînd virionul în celulă.(fig.51)

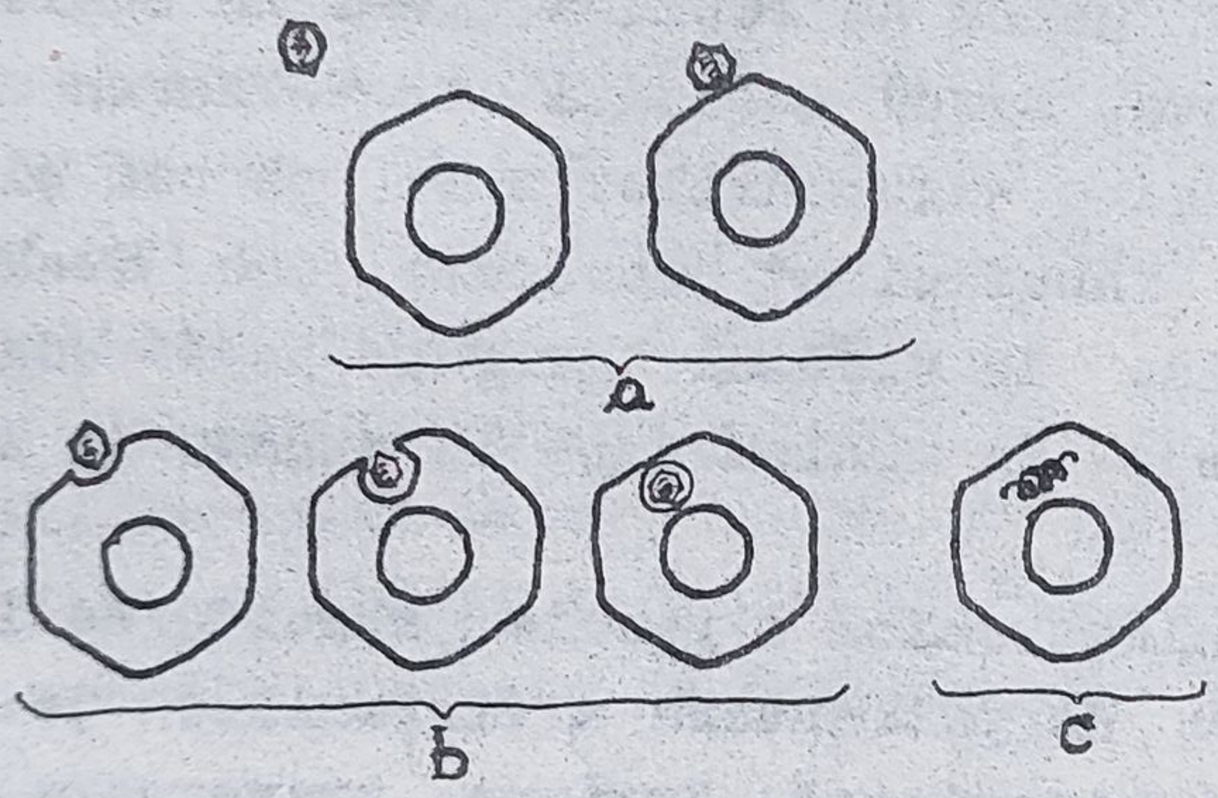


Fig.51.-Reprezentarea schematică a primelor etape din procesul multiplicării virale: fixarea virionului pe celulă(a), pătrunderea în celulă prin viropexie(b) şi decapsidarea virionului(c).

Fuziunea constă într-un proces de "contopire" a structurii de suprafaţă a virionului cu membrana celulară. La zona de contact se formează astfel un "canal" prin care virionul poate trece în citoplasmă. Pătrunderea prin fuziune este caracteristică unor virusuri cu înveliş pericapsidal din grupele Paramyxo şi Pox.

La Paramyxovirusuri procesul este dependent de anumite proteine, în special glicoproteine (proteine de fuziune), care se găsesc inclavate în stratul dublu lipidic al pericapsidei şi au rol în iniţierea infectivităţii.

La unele virusuri (v.Sendai v.vaccinal etc.) cele două mecanisme pot coexista, fuziunea fiind o etapă premergătoare viropexiei.

In cazuri particulare, virionii pot pătrunde în celule şi prin alte mecanisme puţin cunoscute; de exemplu, prin breşe formate la zona de contact, datorită capacităţii virusului de a leza membrana celulară şi propriul său înveliş.

După pătrunderea în celulă, virionii sînt deplaşaţi rapid la locul unde genomul lor poate acţiona eficient, în vederea replicării (multiplicării) virale. Virusurile care se multiplică în citoplasmă ajung la destinaţie imediat după traversarea membranei citoplasmatice. Cele al căror genom se replică însă în nucleu (Adeno, Herpes, Papova, Myxo) necesită traversarea rapidă a citoplasmei şi a structurilor sale, pe căi şi prin mecanisme încă insuficient cunoscute, dar foarte eficiente. De exemplu, la virusul gripal 5o % din virioni se găsesc deja în nucleu după 15 minute de la infecţie.

Microscopia electronică a permis elucidarea în parte a mecanismelor de pătrundere a virionilor prin membrana nucleară (pinocitoză, fuziune, traversare prin porii nucleari). Astfel, virusurile Papova şi cele ale leucozelor aviare traversează citoplasma încorporate în vacuole, iar pătrunderea în nucleu se realizează prin fuziunea peretelui lipo-proteic al vacuolelor cu membrana nucleară. La Adenovirusuri, virionii sînt eliberaţi din vacuole; ei traversează matricea citoplasmatică, iar după decapsidarea lor genomul viral eliberat pătrunde prin porii nucleari.

5.1.3. <u>DECAPSIDAREA</u>. Degradarea capsidei (şi a paricapsidei) se realizează prin mecanisme variate de la un virus la altul. In proces intervin enzime denumite "decapsidaze", produse de celulă, dar specificate de virus. Degradarea începe de regulă imediat ce virionii au pătruns în citoplasmă sau au fost eliberaţi din vacuole, genomul viral putînd să-şi exercite funcţiile numai după eliberarea din virion (parţială sau totală).

La Picornovirusuri (v.enterice şi altele) decapsidarea şi eliberarea genomului începe încă de la nivelul membranei celulare, chiar din faza cînd virusul pătrunde în celule. La Adenovirusuri procesul începe în citoplasmă; capsida incosaedrală este lezată iniţial la vîrfuri, în punctele sale cele mai fragile, în zona ocupată de pentoni şi fibrele lor. Genomul viral iese apoi prin breşele formate, cînd virionii ajung în zona perinucleară şi la nivelul porilor nucleari.

La Reovirusuri, timpul necesar pentru adsorbţia şi decapsidarea virionilor variază de la cîteva minute, la cîteva ore. Transcriptazele care sînt asociate virionului îşi pot însă exercita funcţiile încă înainte de "dezvelirea" completă a virusului.

Decapsidarea Poxivirusurilor se produce în citoplasmă. Procesul este complex şi durează cca 1 oră de la infecţie, ADN-ul conţinut în "corpul central" iese prin breşele formate în învelişurile proteice ale virionului.

O dată cu decapsidarea şi eliberarea genomului viral se trece în starea de "virus vegetativ". De la acest stadiu procesele pot evolua în două direcţii, fie spre "<u>ciclul productiv</u>" care duce la formarea în celulă de noi particule virale, fie spre "<u>integrarea" genomului viral</u> în genomul celular şi menţinerea sa în celulă în stare de "provirus" (ciclu neproductiv).

5.1.4. CICLUL PRODUCTIV. Cuprinde o succesiune de procese deosebit de complexe şi dinamice, în cursul cărora se realizează biosinteza componentelor virale şi producerea de noi virioni. In tot acest timp, virusul se menţine în celulă (în citoplasmă sau nucleu) sub formă de acid nucleic. Intrucît în această stare virusul nu mai poate fi pus în evidenţă electrono-optic, perioada a fost denumită iniţial impropriu ca "faza de eclipsă". Durata acesteia variază în limite largi de la un virus la altul: 1-2 ore la Poliovirus, 3-5 ore la Herpesvirusuri şi Myxovirusuri, 4 ore la Reovirusuri şi Poxvirusuri, 8-le ore la Adenovirusuri şi 12-14 ore la Papovavirusuri.

După eliberarea sa din virion, genomul viral dezorganizează activitatea celulei, subordonîndu-şi genomul acesteia şi "aparatul" de biosinteză a proteinelor. Celula este obligată să lucreze în continuare pentru sinteza componentelor virale, conform "programului" codificat în structura acidului nucleic viral. Multe virusuri ARN blochează sinteza proteinelor celulare aproape total (7o - 9o %) încă din prima oră de la pătrunderea lor în celulă. Concomitent se produce o reorganizare a poliribozomilor, care sînt transformaţi din tipul celular 2oo S în poliribozomi virali de 35o S, capabili să recep-ţioneze doar informaţia genetică a ARN virali.

Procesele şi mecanismele implicate în multiplicarea virusurilor prezintă numeroase caracteristici distinctive de la un virus la altul, determinate de natura şi structura genomului viral (ADN sau ARN dublu sau monocatenar), de bogăţia sa în gene, de modalitatea de replicare şi de codificare a biosintezei proteinelor virale, de unele particularităţi ale complexului virus-celulă etc. Sub acest aspect, virusurile zootrope şi-au format scheme şi strategii mult diversificate. Indiferent însă de natura acestora, în succesiunea proceselor

se disting în toate cazurile cîteva etape esenţiale: biosinteza proteinelor virale, replicarea genomului viral şi asamblarea (morfogeneza) virionilor.

5.1.4.1. BIOSINTEZA PROTEINELOR VIRALE. Biosinteza proteinelor specificate de genomul viral decurge într-o succesiune ordonată, în conformitate cu determinismul genetic al fiecărui virus sau grup de virusuri. In principiu, sinteza unor proteine virale începe "timpuriu", imediat după eliberarea genomului viral în celulă, în timp ce sinteza altora se produce "tardiv", concomitent sau după replicarea genomului viral. La dezoxivirusuri acest fapt este determinat de existenţa a două tipuri de gene, unele"precoce" şi altele"tardive", care intră în funcţiune în momente diferite ale ciclului de replicare. Genele "precoce" se transcriu în ARN m direct de pe genomul viral pătruns în celulă. Transcrierea începe la unele virusuri încă din faza de decapsidare. Din contră, la cele mai multe virusuri genele "tardive" se transcriu de pe genomurile progene (rezultate prin replicare). Unele gene specifică sinteza de "proteine represor" care "stopează" funcţionarea genelor "precoce". Mecanismele de control şi dirijare a ordinii de intrare în funcţiune a genelor virale sînt însă deosebit de complexe şi încă puţin cunoscute.

Proteinele"timpurii". Sinteza lor este specificată de genele "precoce", în perioada care precede replicarea genomului viral.

De regulă, proteinele "timpurii" îndeplinesc rol funcţional şi numai excepţional rol structural. Ele aparţin următoarelor categorii:

- proteine care inhibă genomul celular, blocînd astfel (total sau parţial) sinteza de ARN m şi activitatea metabolică proprie celulei, aceasta fiind subordonată pentru a prelucra cu prioritate informaţia genetică

virală;

- <u>proteine enzimatice</u> de tipul <u>ADN sau ARN-polimeraze, nucleaze, ADN-ligaze</u> etc. necesare pentru activarea şi realizarea replicării genomului viral;

- <u>proteine care formează</u> (în citoplasmă sau în nucleu) "<u>matricea</u>"în care se produce replicarea genomului viral şi morfogeneza virionilor, dînd astfel naştere incluziilor celulare citoplasmatice sau nucleare;

- în mod excepţional, <u>proteine care au rol structural în formarea capsidei</u> sau rol funcţional <u>în iniţierea</u> replicării ADN sau în legarea sa.

<u>Proteinele "tardive"</u>. Sinteza lor e specificată de gene care intră în funcţie mai tîrziu, de regulă după ce a fost amorsată replicarea genomului viral. Biosinteza lor decurge în mare parte paralel cu replicarea genomului. Sînt sintetizate în cantitate mult mai mare, majoritatea lor fiind proteine care intră în structura capsidei. Pe lîngă acestea se sintetizează şi unele proteine cu rol de "control", capabile să stopeze funcţionalitatea genelor timpurii, precum şi proteine cu rol enzimatic care participă în morfogeneza virionilor şi eliberarea lor din celulă. Durata biosintezei acestor proteine este variabilă, în funcţie de capacitatea celulei- gazdă de a produce energia necesară desfăşurării proceselor de multiplicare a virusului.

In cazul unor virusuri, setul de gene care specifică sinteza proteinelor "tardive" se transcrie de pe genomurile progene rezultate prin replicare. Concomitent, printr-un mecanism de reglare, se produce stoparea funcţionării genelor "timpurii".

5.1.4.2. <u>REPLICAREA GENOMULUI VIRAL. SINTEZA DE $\underline{ARN_m}$</u>. In esenţă, funcţiile genomului viral se exprimă prin sinteza de ARN_m, în care se transcrie informaţia

genetică pentru biosinteza proteinelor specific virale, precum şi prin replicarea sa şi formarea de genomuri virale progene.

Strategiile de sinteză a ARN_m sînt diversificate, în raport cu natura şi polaritatea genomului viral.Astfel, la dezoxiribovirusuri, ARN_m este sintetizat de către ARN-polimerazele (transcriptazele) celulare, iar la ribovirusuri de către ARN-polimerazele conţinnte de virioni. Fac excepţie virusurile cu genom $ARN_{m.c}^{(+)}$ care pot îndeplini direct şi funcţia de ARN_m.

La fel de diversificate sînt şi macanismele de replicarea genomurilor virale.

<u>La virusurile cu ADN d.c.</u>$^{(\pm)}$ (Pox, Herpes, Adeno, Papova), catena$^{(+)}$ serveşte ca matriţă pentru sinteza de ARN_m. Replicarea se realizează semiconservativ, catenele fiind scindate după modelul clasic al "fermoarului", fiecare servind apoi ca matriţă pentru sintetizarea catenei congenere (complementare).

<u>La virusurile cu ADN m.c.</u>$^{(+)}$ (Parvovirus),iniţial se produce conversia acestuia în ADN d.c.(formă de replicare), cu participarea unei replicaze celulare,catena$^{(+)}$ servind apoi la sinteza de ARN_m. Replicarea se realizează prin scindarea ADN d.c. replicativ, catena$^{(-)}$ sintetizată pe ADN-ul viral servind ca matriţă la producerea de genomuri virale progene (ADN m.c.$^{(+)}$).

La <u>virusurile cu ARN d.c.</u>$^{(\pm)}$ (Reovirusuri) sinteza de ARN_m se face pe catena$^{(+)}$, similar ca la virusurile cu genom ADN d.c. Replicarea se produce prin scindarea ARN d.c., fiecare catenă servind apoi ca matriţă pentru sinteza catenei complementare şi formarea de genomuri-virale. Se consideră că se sintetizează cantităţi mai mari de catene$^{(+)}$,întrucît acestea servesc atît la sinteza de ARN_m, cît şi la formarea de genomuri virale.

<u>La virusurile cu ARNm.c.</u>$^{(+)}$ (Picorna, Toga) genomul viral îndeplineşte şi rol de ARN_m, putînd agrega

ribozomii celulari; informaţia sa genetică este transcrisă apoi direct în structura proteinelor, Replicarea genomului viral comportă formarea unui ARN d.c. (formă de replicare), cu participarea unei ARN-replicaze de origine celulară, catena de ARN viral$^{(+)}$ servind ca matriţă la sinteza catenei complementare de ARN$^{(-)}$. Molecula de ARN d.c. astfel formată se replică după modelul clasic semiconservativ, pe catena de ARN$^{(-)}$ sintetizîndu-se catene de ARN$^{(+)}$ care sînt de fapt genomuri virale progene. Asemenea modalităţi sînt redate în schemele alăturate (fig.52 şi 53).

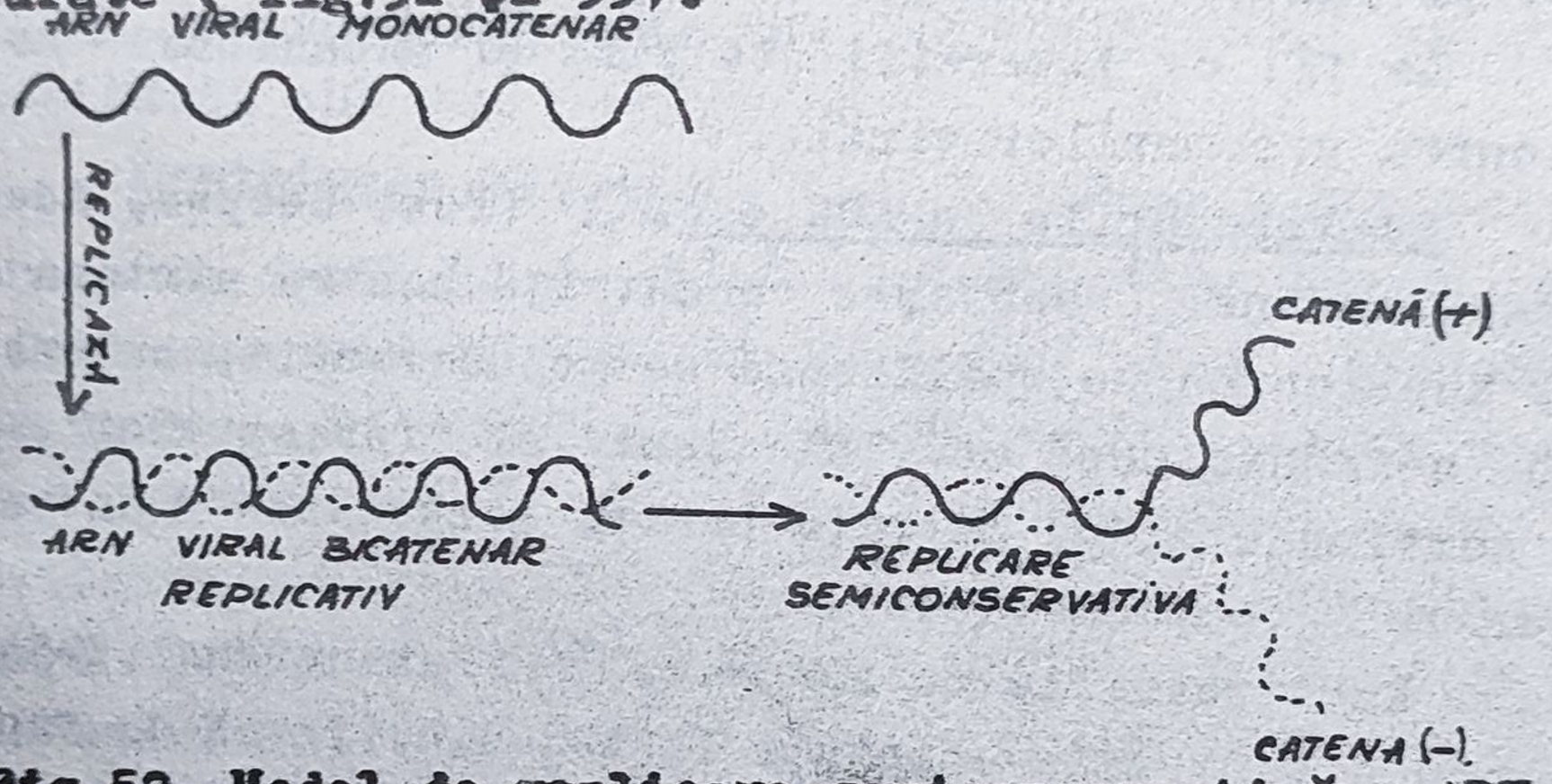


Fig.52.-Model de replicare semiconservativă a ARN-ului viral.Prin mijlocirea unei replicaze,ARN viral m.c.$^{(+)}$ devine dublu catenar(formă replicativă), iar prin scindare acestuia rezultă o catenă de ARN$^{(+)}$ (viral) şi altă catenă de ARN(-).

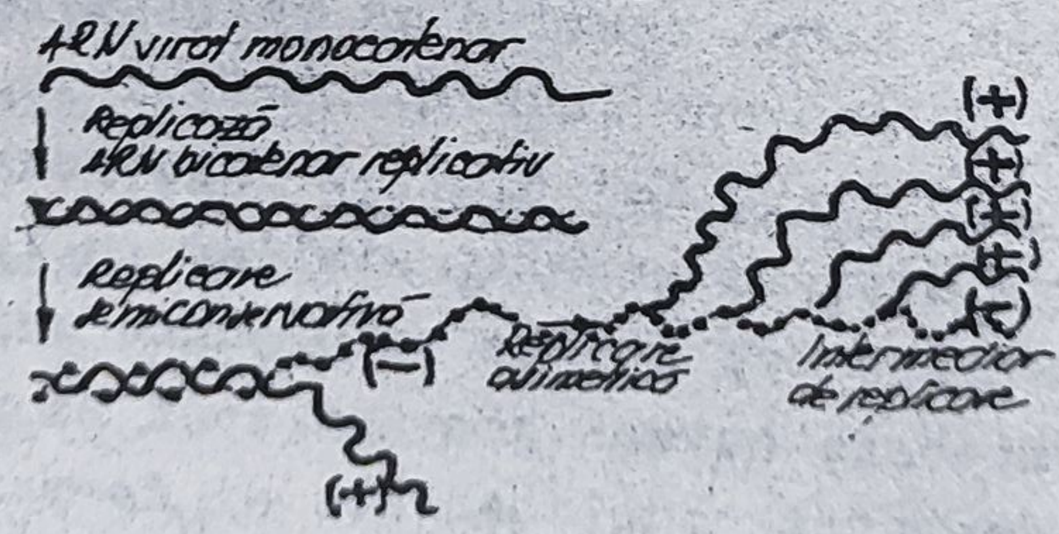


Fig.53.-Model de replicare semiconservativă de tip asimetric a ARN viral. După formarea de ARN d.c. (formă replicativă) şi scindarea sa, catena servşte ca matrice pentru sinteza în serie a mai multor catene$^{(+)}$, respectiv de ARN viral.

La virusurile cu ARN m.c.$^{(-)}$ (Myxo, Paramyxo, Rhabdo) informaţia genetică se transcrie iniţial într-o catenă ARN$^{(+)}$, care este sintetizată cu participarea unei ARN - polimeraze conţinută de virion. Această catenă de ARN$^{(+)}$ serveşte apoi la sinteza de ARN_m. Replicarea genomului se realizează probabil tot pe catenele de ARN$^{(+)}$ sintetizate în celulă, dar modul în care se realizează acest proces nu se cunoaşte încă.

La retrovirusuri, care au genom ARN m.c., procesele au putut fi elucidate abia în ultima perioadă. S-a stabilit astfel că virionii conţin o reverstranscriptază (transcriptază inversă)[1] prin care, pe molecula de ARN m.c. viral se sintetizează iniţial o catenă complementară de ADN. Ca urmare, în prima etapă se formează o moleculă d.c. hibridă de ARN viral + ADN. După scindarea acesteia, catena de ADN (în care s-a transcris informaţia genetică virală) serveşte ca matriţă pentru sinteza complementară a altei catene de ADN, rezultînd astfel un ADN d.c. In continuare, procesul poate evolua spre integrarea moleculei de ADN d.c. în genomul celular. Informaţia genetică virală care se găseşte transcrisă în una din catenele ADN-ului, se poate menţine astfel în celulă sub formă mascată, ca "provirus". Dacă se urmează însă calea ciclului productiv, catena de ADN în care se găseşte transcrisă informaţia genetică virală, serveşte atît la sinteza de ARN_m, cît şi la sinteza de genomuri virale (ARN m.c. viral).

5.1.4.3. MORFOGENEZA VIRIONILOR. Formarea virionilor din componentele lor constitutive (sintetizate separat şi în etape distincte) implică o succesiune de procese care decurg foarte rapid şi care sînt încă parţial cunoscute.

---

1). O ADN - polimerază dependentă de ARN.

Virusurile mici se formează printr-un proces de autoasamblare spontană. Proteinele capsidale se leagă între ele spontan (pe baza complementărităţilor stereochimice, electrostatice, geometrice etc.) formînd astfel un înveliş capsidal bine organizat, în care se încorporează acidul nucleic viral.

Virusurile mai complexe se formează prin procese de morfogeneză mult mai complicate şi insuficient cunoscute, care se desfăşoară coordonat, necesitînd intervenţia unor mecanisme de autoreglare (încă necunoscute).

In raport cu natura şi succesiunea acestor procese de morfogeneză se disting două faze: asamblarea şi maturarea virionilor.

Faza de asamblare se caracterizează prin formarea de particule virale-precursoare (precapsidă-provirion).

Faza de maturare, variabilă ca şi complexitate de la un grup de virusuri la altul, se caracterizează prin pătrunderea genomului viral şi a unor proteine interne minore în precapsidă, Se produce apoi condensarea acidului nucleic viral şi consolidarea învelişului proteic, care se transformă într-o capsidă stabilă. La virusurile mari, aceste procese se realizează cu participarea unor gene care specifică sinteza unor componente cu rol în morfogeneză.

Sediul proceselor de morfogeneză. La ribovirusuri (Polio, Toga, Reo, Paramyxo, Rhabdo) atît replicarea genomului cît şi asamblarea virionilor se realizează de regulă în matricea citoplasmatică, Fac excepţie Ortomyxovirusurile (v.gripal etc.) a căror nucleocapsidă se asamblează în nucleu şi Ocornavirusurile a căror genom se replică în nucleu, dar asamblarea virionului se produce în citoplasmă.

La dezoxiribovirusuri (Herpes, Adeno, Papova), replicarea genomului şi asamblarea nucleocapsidei se produc în nucleu (proteinele capsidale sintetizate în citoplasmă sînt transportate la locul de asamblare în

nucleu). Fac excepţie Poxvirusurile care se replică şi se asamblează în citoplasmă.

Formarea pericapsidei. La virusurile care au peplos maturarea virionilor se desăvîrşeşte odată cu formarea învelişului pericapsidal. Aceste procese se petrec în zona membranei plasmatice, în cursul eliberării virionilor din celulă. Formarea componentelor de înveliş se realizează în mai multe etape succesive. Glico-proteinele virale, care formează spiculii de la suprafaţa pericapsidei, sînt sintetizate în celulă pe baza informaţiei genetice virale. După formarea lor aceste glico-proteine se înseră în membrana citoplasmatică celulară, înlocuind proteinele din stratul dublu-lipidic. Posibilităţile de deplasare în acest strat permit adunarea lor în anumite zone circumscrise. Aici, la faţa internă a membranei citoplasmatice se ataşează proteinele "M" specific virale (de "membrană"), sub forma unui strat subiacent; se formează astfel zone delimitate sau"petice", care sînt "precursorii" învelişului pericapsidal. Proteinele virale conţinute în "petice" leagă nucleocapsidele virale la faţa internă a membranei citoplasmatice, virionii fiind apoi înveliţi treptat în componentele ce alcătuiesc zona respectivă,în cursul eliberării lor din celulă prin procesul de înmugurire". Ca urmare, învelişul pericapsidal are în structura sa unele componente specific virale şi altele de origine celulară, pe care virionul şi le ataşează în faza finală de maturare şi eliberare din celulă.

5.1.5. ELIBERAREA VIRIONILOR DIN CELULA. Se poate realiza, în funcţie de caracteristicile virusurilor, prin cîteva modalităţi: fie rapid şi exploziv prin ruperea membranei celulare, fie lent şi controlat prin traversarea membranei citoplasmatice, a cărei permeabilitate este mărită de alterările produse de virus.

Sînt eliberate mai ușor virusurile mici, mai masiv ribovirusurile. Dezoxiribovirusurile sînt eliberate mai lent și cu o frecvență mai mică, manifestîndu-se în cazul multora tendința de reținere a lor în celulă(face excepție v.herpesului).

Ritmul și intensitatea eliberării virionilor sînt însă procese dependente într-o anumită măsură și de caracteristicile celulelor-gazdă.

In general, virusurile care produc efecte citocide litice sînt eliberate explosiv prin spargerea celulei gazdă. Alte virusuri pot trece direct de la celula infectată la celulele învecinate, cu care se găsesc în raporturi de contiguitate. In majoritatea cazurilor eliberarea virionilor se produce însă printr-un <u>fenomen de exocitoză</u>, care se aseamănă cu un proces de "înmugurire" spre exteriorul membranei citoplasmatice (fig.54). La unele virusuri "înmugurirea" se produce inițial spre interior, virionii fiind incluși în prima etapă în veziculele derivate din membrana citoplasmatică. Ulterior, virionii sînt eliberați din celulă prin fuzionarea peretelui veziculei cu membrana citoplasmatică din care a derivat.

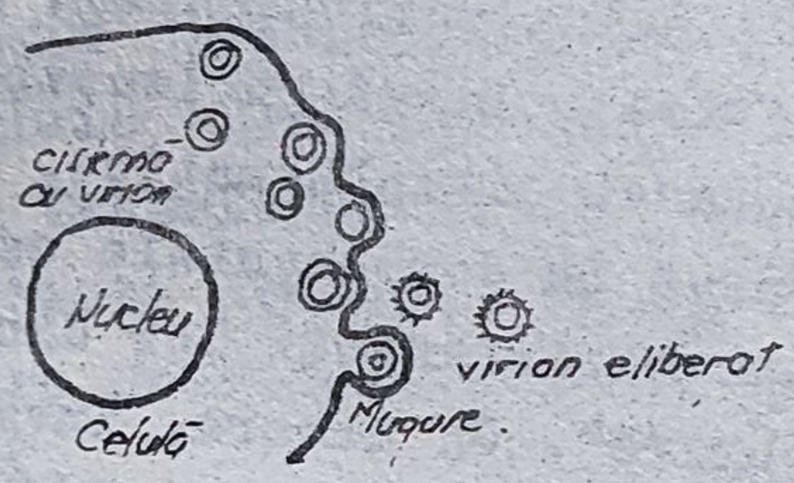


Fig.54.-Reprezentarea schematică a eliberării virionilor din celulă prin "înmugurire".

Unele virusuri (v. herpesului, v. vaccinal) sînt transportate spre periferia celulei, incluse într-o veziculă sau "cisternă" derivată din reticulul endoplasmatic, eliberarea virionilor realizîndu-se printr-o deschizătură formată în membrana celulară.

Eliberarea virionilor din celulă durează pînă la degenerarea acesteia. In general, "înmugurirea" nu

este dăunătoare celulei, leziunile produse în membrana celulară fiind reparate rapid. De aceea, în cazul unor infecţii persistente (oreion, rujeolă etc.) virionii pot fi multiplicaţi şi eliberaţi din celule prin "înmugurire" timp de mai multe generaţii. Durata aproximativă a ciclului productiv şi a perioadei de eclipsă, la cîteva virusuri, sînt redate în tabelul alăturat:

Tabel __

Durata aproximativă a perioadei de eclipsă şi a ciclului de multiplicare(productiv) la cîteva virusuri (după ZARNEA, 1983) , în ore.

Virus	Eclipsă	Ciclul productiv
Poxvirus (v.vaccinal)	4	24
V.herpes simplex	3-5	12-3o
Adenovirus	8-1o	48
Papovavirus (Polioma)	13-14	48
Reovirus	4	15
Myxovirus (v.influenţei)	3-5	18-36
Rhabdovirus (v.stomat.vezic.)	2	8-1o

5.2. TROPISMUL VIRUSURILOR

Prin tropism se înţelege afinitatea pe care virusurile o au pentru regn, specie, ţesut şi tip de celule. Această afinitate este determinată de capacitatea virusului de a putea pătrunde şi de a se putea multiplica în anumite celule. Fiecare virus este, prin urmare, caracterizat printr-un anumit tropism şi implicit spectru de patogenitate.

Tropismul virusurilor se caracterizează în primul rînd printr-o strictă specificitate de regn. Din acest punct de vedere se disting: virusuri fitotrope (patogene pentru plante), virusuri bacteriotrope (patogene pentru bacterii) şi virusuri zootrope (patogene pentru animale şi/sau om).

Toate virusurile sînt caracterizate apoi printr-un tropism de specie (genotropism). Sub acest aspect, virusurile fitrotrope şi bacteriotrope sînt caracterizate printr-o strictă specificitate de gazdă, ele putînd parazita numai o anumită specie. Unele tipuri de bacteriofagi au o specificitate de gazdă atît de accentuată încît pot infecta numai o anumită variantă (tip) a bacteriei receptive.

Genotropismul virusurilor patogene pentru animale este în general mai puţin accentuat. Astfel, unele virusuri au o strictă specificitate de gazdă, fiind patogene în condiţii naturale numai pentru o specie animală sau cîteva specii înrudite (v.poliomielitei şi v.gripal pentru om; v.stomatitei veziculoase pentru bovine; v.pestei porcine pentru suine etc.); altele au un spectru de patogenitate larg, putînd infecta în condiţii naturale numeroase specii animale. De exemplu, v.rabic poate infecta omul şi aproape toate speciile de animale sălbatice şi domestice; v.febrei aftoase poate infecta toate speciile de animale paricopitate (domestice şi sălbatice); v.pseudopestei aviare poate infecta diferite specii de păsări şi om etc.

Virusurile zootrope sînt caracterizate apoi printr-un anumit tropism de ţesut (histotropism). Din acest punct de vedere se disting mai multe categorii:

- virusuri epitelio-dermotrope (v.variolei, v.febrei aftoase, v.herpesului, v.ectimei contagioase a oilor etc.) care au afinitate pentru celulele epiteliale ale mucoaselor şi dermului;

- virusuri neurotrope (v.rabic, v.Aujeszky, v.encefalitelor la om şi animale etc.) care au afinitate pentru celulele ţesutului nervos. In cazul unor virusuri,neurotropismul poate fi expresia afinităţii pentru anumite celule nervoase pe care virusul o are doar în faza finală a procesului infecţios. De exemplu, v.poliomielitei este un virus enterotrop (cu afinitate pentru celulele epiteliului intestinal), dar în faza finală se fixează pe neuronii motori din coarnele anterioare ale măduvii spinării, determinînd manifestările nervoase paralitice caracteristice infecţiei;

- virusuri dermo-neurotrope (Herpesvirusurile)care au tropism pentru celulele dermului şi ale sistemului nervos;

- virusuri organotrope (viscerotrope) care au afinitate pentru celulele unor organe interne. In raport cu organul afectat, acestea pot fi: pneumotrope (v.influenţei, v.parainfluenţei etc.); enterotrope (v.enteropatogene, v.bolii mucoaselor, v.gastro-enteritei porcine etc.) hepatotrope (v.hepatitei omului, v.hepatitelor la animale) etc.;

- virusuri mezenchimotrope (pantrope) care au afinitate pentru diferite celule de origine mezenchimală. (v.pestei porcine ş.a.).Datorită acestui fapt virusurile respective se găsesc în toate organele şi ţesuturile organismului infectat, ele fiind aparent lipsite de tropism pentru un anumit ţesut sau organ.

Unele virusuri zootrope pot fi apoi caracterizate şi printr-un citotropism, manifestat prin afinitate mai pronunţată şi prin capacitatea de a se multiplica mai activ în anumite celule ale ţesutului receptiv. De exemplu, v.rabic se multiplică de preferinţă şi mai intens în celulele piramidale de tip Betz din coarnele lui Amon, iar virusul poliomielitei în neuronii motori din coarnele anterioare ale măduvei.

Toate celulele în care virusurile pot pătrunde şi se pot multiplica sînt definite în general ca"celule permisive". Celulele în care virusul nu se poate multiplica, chiar dacă în unele poate pătrunde, sînt denumite "nepermisive".

Tropismul de specie şi de ţesut nu sînt în toate cazurile(şi în mod obligator) fenomene de tipul "tot sau nimic". Mai mult, în condiţii experimentale barierele tropismului au putut fi învinse la numeroase virusuri, obţinîndu-se variante cu caracteristici de tropism şi patogenitate mult modificate, care s-au dovedit de mare utilitate în vaccinare, la om şi animale.

5.3. EFECTE CITOPATICE

Pătrunderea şi multiplicarea virusurilor în celulele gazdă produce numeroase lezări metabolice şi morfo-structurale, definite ca efecte citopatice. Acestea pot determina:

- degenerarea, moartea şi distrugerea celulelor infectate;

- alterări biochimice şi structurale mai mult sau mai puţin grave, compatibile cu supravieţuirea celulelor;

- perturbări citocinetice care se exprimă prin transformarea malignă a celulelor infectate.

Lezările biochimice produse de virusuri în celule sînt mai greu perceptibile, în timp ce lezările morfo-structurale pot fi evidenţiate în cele mai multe cazuri fără dificultăţi. Intrucît anumite efecte citopatice produse de unele virusuri au caracter de strictă specificitate (de exemplu, formarea de incluzii celulare) punerea lor în evidenţă are o mare importanţă practică, în lucrările de identificare a viru-

surilor şi în diagnosticul bolilor virotice, la om şi animale.

5.3.1. EFECTUL CITOCID. Numeroase virusuri produc alterări biochimice şi structurale progresive, de tip necrobiotic, care duc la moartea celulei infectate şi eliberarea virionilor prin distrugerea acesteia. Virusurile epitelio-dermotrope (v.variolice, v.febrei aftoase, v.stomatitei veziculoase etc.) produc de regulă efecte citocide litice, caracterizate prin degenerarea şi omogenizarea conţinutului endocelular, cu balonizarea excesivă a celulelor infectate (degenerescenţă vacuolizantă), urmată de "spargerea" lor. Asemenea infecţii sînt caracterizate anatomo-clinic prin formarea de leziuni veziculoase pe mucoase şi derm.

In culturile celulare în monostrat, virusurile cu efecte citocide litice produc "plaje", respectiv zone circumscrise, mai mult sau mai puţin întinse, în care celulele au fost distruse prin liză.

In cazul unor infecţii masive, cu evoluţie supraacută, hipertoxică, celulele infectate pot suferi efecte citotoxice rapide şi brutale, chiar înainte de multiplicarea virusului.

5.3.2. ABERATIILE CROMOZOMALE. Unele virusuri (Adenovirus, Herpesvirus, v.vaccinal, Paramyxovirus, Leucovirus etc.) determină lezări ale cromozomilor, care constau în ruperea şi fragmentarea unor cromatide şi mai rar în "pulverizarea" lor (probabil ca urmare a lezării lizozomilor şi a eliberării nucleazelor conţinute de aceştia).

5.3.3. FUZIUNILE CELULARE. Unele virusuri cu pericapsidă (Paramyxovirusuri, Herpesvirusuri) determină frecvent fuziuni celulare, cu formarea de celule

sincitiale gigante şi multinucleate (cu sute sau chiar mii de nuclei). Asemenea efecte citopatice se produc mai ales în culturile celulare. Ele pot survenі între celule identice genetic, cu formarea de <u>homocarioni</u> sau între celule de origine diferită (om-şoarece) cu formarea de <u>heterocarioni</u>.

Mecanismele fuziunii celulare au putut fi elucidate prin cercetările efectuate cu v.Sendai inactivat prin iradiere. Virionii inactivaţi ai acestuia sînt neinfecţioşi, dar îşi păstrează capacitatea hemaglutinantă şi proprietatea de a produce fuziuni între celulele învecinate, pe a căror membrană s-au fixat concomitent. Procesul este iniţiat de o proteină virală ("proteina F") care se găseşte inclavată în stratul dublu-lipidic al pericapsidei (înveliş pe care virionii şi l-au format din membrana celulară, în cursul eliberării lor din celulă).

Proprietatea de a produce fuziuni celulare constituie un criteriu important de identificare a virusurilor respective şi de evidenţoere a prezenţei lor în anumite materiale patologice.

5.3.4. <u>EFECTUL INCLUZIOGEN</u>. Majoritatea virusurilor zootrope produc în celule leziuni deosebit de caracteristice, exprimate prin formarea de <u>incluzii virale</u> (corpusculi). Incluziile virale sînt structuri de neoformaţie, cu aspect corpuscular şi cu proprietăţi de regulă oxifile, care iau naştere în celulele şi ţesuturile pentru care virusul manifestă tropism. Au dimensiuni variabile între 1 - 30 micrometri. Evidenţierea lor prin metode speciale de colorare constituie un mijloc de mare importanţă practică în diagnosticul multor boli virotice la om şi animale. De fapt, unele incluzii virale au fost descoperite şi descrise cu mult înaintea identificării virusurilor respective.

Locul în care se formează incluziile în celulă

diferă de la un virus la altul. Ele se produc obişnuit în zona de replicare a virusului. Astfel, unele virusuri produc <u>incluzii intracitoplasmatice</u> (v.variolice, v.rabic, v.Reo etc.), altele <u>incluzii intranucleare</u> (v.Adeno, v.herpesului, v.poliomielitei, v.varicelei, v.bolii de Borna, v.pestei porcine, v.hepatitei canine, v.pestei aviare etc.), iar cîteva atît incluzii <u>intracitoplasmatice cît şi intranucleare</u> (v.pojarului, v.Aujeszky s.a.). Ele sînt denumite, în cele mai multe cazuri, după cercetătorii care le-au descoperit şi descris prima dată. De exemplu, <u>incluzii BABES - NEGRI</u> cele produse de <u>v.rabic</u> în citoplasma celulelor nervoase piramidale (de preferinţă din cornul lui Amon); <u>incluzii GUARNIERI</u> cele produse de <u>v. variolic vaccinal</u>; <u>incluzii BOLLINGER</u> cele produse de <u>v. diftero-variolei aviare</u>; <u>incluzii BORREL</u> cele produse de <u>virusul variolei ovine</u> etc. Incluziile au fost identificate, de asemenea, în numeroase alte boli virotice:herpes, varicelă, febră galbenă, poliomielită, boala de Borna, pesta porcină, pesta aviară, hepatita canină, boala lui Aujeszky, avortul virotic al cailor, pesta bovină etc.

Natura şi semnificaţia biologică a incluziilor au constituit probleme mult controversate. Incluziogeneza este un proces care evoluează progresiv odată cu ciclul de multiplicare al virusului, ele fiind considerate astăzi zone sau "sedii" celulare în care se realizează replicarea acidului nucleic viral, biosinteza proteinelor şi asamblarea virionilor. In fazele precoce sînt Feulgen-pozitive, datorită acizilor nucleici virali conţinuţi în structura lor. In fazele tardive, incluziile sînt însă lipsite de material viral, ele reprezentînd doar "sediul" sau "matricea" celulară în care virusul a fost multiplicat.

5.3.5. <u>EFECTUL ONCOGEN (TRANSFORMANT)</u>. Unele virusuri produc modificări celulare (metabolic-funcţionale, structurale şi de comportament) exprimate prin multi-

plicarea intensă şi anarhică, de tip tumoral, a celulelor infectate. Asemenea efecte citocinetice potenţial oncogene îl au aproximativ 15o de virusuri, din totalul de aproximativ 6oo de virusuri identificate pînă în prezent la animale. Dintre acestea, unele virusuri produc boli cu manifestări tumorale caracteristice (leucozele aviare, leucoza taurinelor, mixomatoza iepurilor, sarcomul lui Rous la păsări etc.) Alte virusuri îşi exprimă potenţialul encogen numai dacă sînt inoculate experimental la anumite specii de animale nereceptive natural. De exemplu, virusul SV 4o (simian vacuolizant 4o) se găseşte în condiţii naturale, în stare latentă, în rinichiul de maimuţă, fără să producă aici tulburări, dar inoculat la hamster are acţiune oncogenă.

Se consideră astăzi că efectele oncogene sînt în majoritatea cazurilor consecinţa integrării genomului viral în genomul celular, suplimentul de material genetic viral fiind capabil să inducă în final transformarea şi proliferarea tumorală a celulelor respective. Datele experimentale acumulate în acest domeniu stau la baza argumentării rolului posibil pe care îl au unele virusuri în etiopatogenia bolii canceroase.

5.3.6. <u>EFECTUL ONCOLITIC</u>. Unele virusuri capabile să se multiplice în celulele tumorale pot opri evoluţia procesului, determinînd chiar regresul şi liza tumorii. Efectul ar putea fi explicat prin utilizarea, la biosinteza componentelor virale, a unor compuşi indispensabili pentru dezvoltarea celulelor tumorale. Celulele astfel lezate devin accesibile fagocitozei, ceea ce duce la ramolismentul tumorii.

Utilizarea unor asemenea virusuri în terapia cancerului nu este însă posibilă, întrucît ele au şi o acţiune nocivă pentru sistemul nervos.

5.4. FENOMENUL DE INTERFERENTA.

Organismele şi celulele infectate cu anumite virusuri devin într-un timp foarte scurt (ore) rezistente la reinfecţia cu alte virusuri, fenomenul fiind denumit interferenţă virală. Procesul se aseamănă formal cu ceea ce s-ar putea numi "dreptul primului ocupant". Cu alte cuvinte, primul virus care a pătruns în celulă, datorită prezenţei sale şi a modificărilor pe care le induce, face ca celula să devină improprie să multiplice un al doilea virus. Virusul care declanşează fenomenul este denumit virus interferent sau inductor, iar cel a cărui pătrundere sau multiplicare este oprită se numeşte virus interferat sau revelator (al efectului interferent).

Fenomenul de interferenţă a fost descoperit prima dată de MAGRASSI (1934) în cursul cercetărilor efectuate cu două tipuri de virus herpetic. El a constatat că infectarea iepurilor pe cale corneeană cu o suşă de virus herpetic slab patogenă (cheratogenă) previne reinfecţia cu o altă suşă de virus herpetic puternic patogenă (encefalitogenă) inoculată intracerebral. Cercetările ulterioare au stabilit că asemenea procese de interferenţă se pot produce şi între alte virusuri (de exemplu, la v.febrei galbene, între o variantă neurotropă şi alta viscerotropă; la virusul influenţei, între o variantă avirulentă şi alta virulentă etc.).

Interfevenţa poate fi indusă experimental nu numai între variante ale aceluiaşi virus, ci şi între virusuri diferite, dar care au tropism identic. Astfel, v.coriomeningitei limfocitare inoculat la maimuţă poate preveni infecţia cu v.poliomielitei; v.grîpal A inoculat la embrionii de găină interferează infecţia cu v.pseudopestei aviare; v.coxsackie B interferează în cul-

5.4. FENOMENUL DE INTERFERENTA.

Organismele şi celulele infectate cu anumite virusuri devin într-un timp foarte scurt (ore) rezistente la reinfecţia cu alte virusuri, fenomenul fiind denumit interferenţă virală. Procesul se aseamănă formal cu ceea ce s-ar putea numi "dreptul primului ocupant". Cu alte cuvinte, primul virus care a pătruns în celulă, datorită prezenţei sale şi a modificărilor pe care le induce, face ca celula să devină improprie să multiplice un al doilea virus. Virusul care declanşează fenomenul este denumit virus interferent sau inductor, iar cel a cărui pătrundere sau multiplicare este oprită se numeşte virus interferat sau revelator (al efectului interferent).

Fenomenul de interferenţă a fost descoperit prima dată de MAGRASSI (1934) în cursul cercetărilor efectuate cu două tipuri de virus herpetic. El a constatat că infectarea iepurilor pe cale corneeană cu o suşă de virus herpetic slab patogenă (cheratogenă) previne reinfecţia cu o altă suşă de virus herpetic puternic patogenă (encefalitogenă) inoculată intracerebral. Cercetările ulterioare au stabilit că asemenea procese de interferenţă se pot produce şi între alte virusuri (de exemplu, la v.febrei galbene, între o variantă neurotropă şi alta viscerotropă; la virusul influenţei, între o variantă avirulentă şi alta virulentă etc.).

Interferenţa poate fi indusă experimental nu numai între variante ale aceluiaşi virus, ci şi între virusuri diferite, dar care au tropism identic. Astfel, v.coriomeningitei limfocitare inoculat la maimuţă poate preveni infecţia cu v.poliomielitei; v.grîpal A inoculat la embrionii de găină interferează infecţia cu v.pseudopestei aviare; v.coxsackie B interferează în cul-

turi celulare multiplicarea v.poliomielitei etc.

Se poate conchide că, în condiţii naturale sau experimentale, fenomenele de interferenţă se pot manifesta relativ frecvent şi pe plan biologic larg. În raport cu virusurile care sînt implicate în proces, se disting două tipuri de interferenţă: omoloagă şi heteroloagă.

Interferenţa omoloagă se produce între variante (tipuri) sau suşe aparţinînd aceleiaşi specii de virus. În unele cazuri interferenţa poate fi indusă chiar de virionii inactivaţi prin radiaţii U.V. şi la care s-a conservat neuraminidaza şi capacitatea de a pătrunde în celulele receptive. De exemplu, v.gripal A inactivat cu U.V., pus în contact 3 ore cu celulele receptive, inhibă multiplicarea v.gripal A viu, dar nu pe a virusului gripal tip B; v.pseudopestei aviare inactivat inhibă multiplicarea în celulele embrionului de găină a virusului viu al pseudopestei aviare etc.

Interferenţa heteroloagă se produce între specii diferite de virusuri şi este în general mai complexă. Trebuie menţionat însă că interferenţa nu se poate realiza între oricare virusuri, ci numai între virusurile care au tropism pentru aceleaşi celule şi care pătrund şi se multiplică în celulele "permisive" la nivele structurale şi prin mecanisme identice sau foarte apropiate. Alt fel, dacă procesele se realizează la nivele structurale diferite, virusurile respective se pot multiplica concomitent în aceleaşi celule. De exemplu, nu se produce interferenţa între v.herpesului şi v.vaccinal, întrucît primul se multiplică şi se asamblează în nucleu, iar al doilea în citoplasmă. Mai mult , unele virusuri nu numai că pot coexista în celule, ci prezenţa unuia poate exercita un efect de stimulare a celuilalt, potenţîndu-i virulenţa.

Mecanismele interferenţei. Timpul de inducţie a

interferenţei este foarte scurt, de regulă 1-2 minute în cazul unor interferenţe omoloage, pînă la 4-5 ore în cazul unor interferenţe heteroloage.

Durata stării de interferenţă este de asemenea diferită, fiind de regulă mai scurtă, în procesele de interferenţă omoloagă (26-6o ore) şi mult mai lungă în interferenţa heteroloagă.

Aceste deosebiri scot în evidenţa complexitatea fenomenului şi faptul că se realizează prin mecanisme multiple, procesele de interferenţă fiind induse foarte rapid de conflictul virusului cu celula, căreia îi impune restructurări morfo-funcţionale care o fac inaptă să mai cultive virusul interferat. Celula îşi păstrează însă intactă capacitatea de a multiplica primul virus, respectiv virusul interferent.

La baza interferenţei stau cîteva mecanisme esenţiale.

- <u>Excluderea mutuală</u> constituie un mecanism frecvent în procesele de interferenţă omoloagă (de exemplu, la Myxovirusuri, între diferitele variante ale aceleiaşi specii sau între virusul inactivat cu U.V şi virusul viu). In aceste cazuri virusul interferent distruge, prin neuraminidaza din spiculi, receptorii de la suprafaţa celulei şi, ca urmare, virusul interferat nu se mai poate fixa pe celulă. Starea de interferenţă durează pînă cînd celula îşi regenerează receptorii (26-6o ore).

- <u>Blocarea replicării intracelulare</u> constituie un mecanism frecvent în procesele de interferenţă heteroloagă, respectiv între virusurile care sînt multiplicate în celulele permisive în aceleaşi zone, cu subordonarea aceloraşi organite, căi şi sisteme celulare. Acestea sînt blocate de primul virus şi, ca urmare, virusul interferent-deşi poate pătrunde în celule- nu se mai poate replica, fiind pînă la urmă dezintegrat. Acest tip de interferenţă durează toată perioada

prezenţei şi replicării în celulă a virusului interferent.

- Interferenţa prin interferoni este cea mai frecventă şi mai amplu studiată. In majoritatea cazurilor celulele intrate în conflict cu virusul reacţionează în cel mult cîteva ore prin sinteza şi excreţia de interferon. De exemplu, interferonul poate fi detectat în serul sangvin la şoarece chiar la o oră de la infecţie, atingînd concentraţia maximă după cca 4 ore. Sinteza sa durează relativ puţin, cca 18-2o ore, după care celulele devin incapabile să mai producă interferon.

Existenţa unor asemenea fenomene produse prin substanţe cu acţiune antivirală au fost admise ipotetic, înaintea descoperirii interferonului de către ISAACS şi LINDEMANN (1957).

INTERFERONUL. Este o substanţă glico-proteică cu acţiune antivirală nespecifică şi cu spectru larg, capabilă să înhibe multiplicarea oricărui virus în celulele organismelor aparţinînd speciei care l-a produs sau a speciilor strîns înrudite filogenetic. Acţiunea protectoare antivirală este foarte slabă sau nulă pentru celulele altor specii. De exemplu, interferonul sintetizat de celulele de şoarece îşi menţine acţiunea protectoare în proporţie de numai 5 % pentru şobolan şi este total inactiv pentru om. Pe de altă parte, interferonul produs de o anumită celulă are aceleaşi proprietăţi fizico-chimice şi biologice indiferent de virusul sau factorii care i-au indus sinteza.

Faptul că acţiunea protectoare a interferonului este maximă pentru sistemul celular în care a fost produs atestă că sinteza sa este specificată de genomul celular. Asemenea informaţie genetică se găseşte în patrimoniul ereditar al tuturor celulelor la vertebrate, genele respective găsindu-se normal în stare reprimată. Derepresia acestor gene, urmată de sinteza de

interferon, se poate produce sub acţiunea unor factori inductori variaţi, virali sau de altă natură, cu care celula intră în conflict.

Factorii inducători. Sinteza interferonului poate fi indusă nu numai de virusuri, ci şi de alţi agenţi: microorganisme parazite endocelular (ricketsii, chlamidii, micoplasme, protozoare), endotoxinele bacteriene lipo-polizaharidice, macromolecule de ARN d.c. sintetizate artificial, precum şi de unii polimeri sintetici (acid poliacridilic sau polivinilic), de unele substanţe cu g.m. mică (de tipul kanamicinei, cicloheximidei şi coloranţilor bazici) etc.

Cea mai intensă acţiune inductoare o au virusurile ARN, în special cele care conţin ARN d.c., precum şi preparatele care conţin macromolecule de ARN d.c. sintetizate artificial sau ARN extras din anumite microorganisme (Mycobacterii, levuri etc.)

In cazul virusurilor s-a dovedit că inductorul este reprezentat totdeauna de macromolecule helicale de ARN d.c. cu g.m. foarte mică. La virusurile cu genom ARN d.c. inductorul este chiar genomul viral, iar la celelalte ribovirusuri. ARN d.c. "forma replicativă" care se formează în celulă în cursul replicării virale. La virusurile ADN inductorul este un tip de ARN d.c. care rezultă prin replicarea ARNm viral (după ZARNEA, 1983) Moleculele de ARN d.c. produc depresia genelor care specifică sinteza interferonului, neutralizînd represorul printr-un mecanism încă necunoscut. Ceilalţi inductori acţionează prin alte mecanisme.

Efectele biologice şi mecanismele de acţiune. Interferonul formează un "grup de proteine" cu acţiune antivirală, care sînt dotate şi cu alte proprietăţi biologice, în special anticelulare, antitumorale şi imunomodulatoare.

Interferonul nu acţionează direct ca efector

antiviral, ci ca inductor a stării de rezistenţă nespecifică a celulelor faţă de virusuri. Moleculele de interferon. eliberate din celule se leagă la suprafaţa membranei acestora prin intermediul unor receptori determinînd modificări de suprafaţă, care, la rîndul lor, induc în celulă o serie de reacţii de sinteză, inclusiv sinteza unei proteine cu acţiune antivirală. Această proteină încă neidentificată este de fapt cea care conferă celulei starea de rezistenţă antivirală. Ea inhibă replicarea virusului în celulă, blocînd transcrierea şi /sau traducerea informaţiei genetice virale, prin interferarea fie a sintezei de ARN_m, fie a sintezei proteinelor, fie a ambelor. Printr-un mecanism de amplificare, o singură moleculă de interferon poate induce sinteza de cantităţi mari de proteină antivirală. Ansamblul interferon-proteină antivirală constituie " sistemul interferon".

Interferonul are asupra organismului în care s-a format acţiuni şi efecte multiple.

Efectul antiviral. Sinteza de interferon constituie unul din mecanismele de apărare naturală antivirală din prima linie. Producerea sa la numai cîteva ore de la conflictul celulei cu virusul este reacţia cea mai precoce de apărare a celulei şi a organismului gazdă. Sînt sensibile la interferon toate virusurile, deşi sensibilitatea lor poate varia în limite largi. Are o acţiune preventivă foarte puternică, fiind una din proteinele cele mai active biologic. De exemplu, "în vitro" exercită o acţiune protectoare pentru celule în concentraţii de 10^{-15} M.

In cazul utilizării în scop terapeutic atenuiază evoluţia bolii. Utilizarea sa se loveşte însă de dificultăţi de a-l obţine şi purifica.

Efectul antitumoral. Interferonul încetineşte ritmul de multiplicare a celulelor normale şi tumorale.

Efectul antitumoral este însă şi consecinţa unor modificări pe care le produce la nivelul membranei celulelor tumorale, ceea ce face ca sistemele de apărare ale organismului să le recunoască mai repede ca "străine" şi să le elimine. Pe de altă parte, interferonul intensifică acţiunea fagocitară a mononuclearelor (macrofagelor) şi citotoxicitatea limfocitelor faţă de celulele tumorale „ţintă", în special a limfocitelor K (kiler-ucigaş) specializate în rezistenţa naturală a organismelor la tumori.

Efectul imunomodulator. Interferonul intervine în reglarea răspunsului imun, prin acţiunea favorabilă pe care o poate exercita asupra imunocompetenţei sau prin efectul imunodepresor (sau chiar imunosupresor). Organismele sintetizează interferon în mod natural cu rol de substanţă imunoreglatoare locală şi generală, în cel puţin trei arii anatomice: tractul oro-gastro-intestinal, în rinofaringe şi bronhii şi în celulele sistemului imun (central şi periferic). De altfel, limfocitele stimulate de virus produc un tip de interferon cu caracteristici deosebite, definit ca "interferon imun" şi care face parte din limfokinele elaborate de aceste limfocite activate imunologic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1.BELÁK, S., TUBOLY, S., VARGA, J.- 1983. Állatorvosi mikrobiológia. Ed.Mezögazd.Kiadó. Budapesta.

2.BILBIE, V., POZSGI, N. - 1984 - Bacteriologie medicală, vol.I. Ed. Med.Bucureşti.

3.GHINEA,L., PAL, G.- 1982. Microbul-un gigant. Ed.şt.şi Enciclop.Bucureşti.

4.IVANOF,A., CIUPE, M., SASCA, C., VANCEA, D.- 1982. Microbiologie. E.D.P. Bucureşti.

5.MOUSTARDIER, G. - 1972. Bactériologie médicale. Lib.Maloine S.A. Ed. Paris.

6.ONET, E. - 1982 - Virusuri şi viroze animale. Ed.Dacia Cluj-Napoca.

7.POPA, O. - 1969 -Curs de microbiologie şi imunologie. Ed.IAT Timişoara.

8.POPA,O.- 1973 -Curs de microbiologie şi patologie animală. Ed. IAT Timişoara.

9.POPA, O., BRAN L., GRECIANU, AL., BUHATEL, T.- 1976. Patologie animală. EDP. Bucureşti.

1o.RADUCANESCU, H.- 198o. Microbiologie generală.vol.I.şi II (curs) Ed. I.A. "N.Bălcescu" Bucureşti.

11.RADUCANESCU, H., BICA-POPII, V.- 1986 - Bacteriologie veterinară. Ed.Ceres Bucureşti.

12.STAMATIN. N. - 1965 -Microbiologie şi imunologie veterinară. E.D.P. Bucureşti.

13 STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, A.-1966. Précis de Microbiologie générale. Ed.Masson. Paris.

14. VOICULESCU,C., MIHANCEA, N.- 1982. Virusuri şi reactivitate. Ed.Scrisul Românesc Craiova.

15.ZARNEA, G., -1983. Tratat de Microbiologie generală. Vol.I.

-1984. Tratat de Microbiologie generală Vol.II.Ed.Acad. RSR Bucuresti.